

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Fonctionnalisation de nanoparticules plasmoniques pour le ciblage de cellules
du cancer du sein *in vitro***

AUDREY NSAMELA MATOMBI

Institut de génie biomédical

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie biomédical

Août 2019

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

**Fonctionnalisation de nanoparticules plasmoniques pour le ciblage de cellules
du cancer du sein *in vitro***

présenté par **Audrey NSAMELA MATOMBI**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

L'Hocine YAHIA, président

Michel MEUNIER, membre et directeur de recherche

Louis GABOURY, membre

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie mon directeur Michel Meunier et son associé Sergiy Patskovsky pour m'avoir accueillie dans le labo, de m'avoir offert un projet stimulant et diversifié et de m'avoir laissé une grande liberté d'action.

Merci aux "nano-party-girls" Cécile Darviot, Lu Wang, Jennyfer Zappata, Isabelle Largilière et Léonidas Agiotis pour la bonne ambiance, les bons moments ("Mi Mi Mi") et pour toute l'aide apportée durant mon projet. Vous étiez la meilleure équipe que je pouvais espérer ! Je remercie également Morteza H.K. qui, malgré la dose de stress supplémentaire, m'a énormément boosté durant mes expériences et m'a redonné espoir dans mon projet. Merci au reste de l'équipe pour vos précieux conseils : Kurt Ebeling, Mengjiao Qi et Paule Marcoux-Valiquette.

Un grand merci à la plateforme NanoBio de TransMedTech et plus particulièrement à Benoit Liberelle et Frédéric Murschel de m'avoir aidée à réaliser mes expériences en SPR et pour m'avoir apporté un regard extérieur et bienvenu sur les différents aspects de mon projet. Merci au professeur Gregory de Crezzenzo de m'avoir permis d'utiliser son laboratoire et des outils de mesures de qualité.

Finalement, je souhaite remercier Alexandre Py, qui m'a été d'un soutien inégalé durant ma maîtrise, merci de m'avoir supportée après mes longues journées de labo, de m'avoir empêchée de jeter mon ordinateur par la fenêtre et surtout, merci d'être un partenaire en or. Je remercie également ma maman, qui a toujours cru en moi et qui a "gestoefd" de moi à toute la Belgique.

RÉSUMÉ

Le cancer du sein représente un quart des cas de cancer diagnostiqués chez les femmes au Canada. De nos jours, le moyen le plus efficace de diagnostiquer le cancer du sein consiste à effectuer une biopsie de la zone suspecte chez le patient et à l'analyser en laboratoire. L'étalon d'or utilisé par les pathologistes pour déterminer si les tissus sont cancéreux ou non est la coloration par immunohistochimie (IHC). Cette méthode présente plusieurs inconvénients, tels que la dégradation possible des antigènes ciblés en raison de l'utilisation d'agents de fixation (Formaline, etc.) ou la difficulté à cibler plusieurs antigènes dans un même échantillon. Dans ce projet sera présenté un moyen de répondre à ces problèmes en utilisant des nanoparticules (NP) plasmoniques fonctionnalisées avec des anticorps (Ac) pour cibler spécifiquement des cellules du cancer du sein. Outre une grande stabilité qui permet d'éviter l'utilisation d'agents de fixation avant le marquage des cellules, les NPs biocompatibles ont des propriétés optiques particulières qui permettent de les visualiser et de les compter facilement. L'objectif final est de développer et appliquer un protocole robuste qui pourra être appliqué directement par les pathologistes au Canada et montrera des résultats capables de rivaliser avec l'IHC.

La première partie du mémoire concerne la fonctionnalisation des NPs et leur caractérisation. Trois approches de fonctionnalisation ont été testées : EDC/((Sulfo-)NHS (*N*-3-(dimethylamino)propyl-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride/ *N*-Hydroxy(sulfo)succinimide), NHS et Hydrazide. Ces noms font référence au groupe fonctionnel qui se lie à l'Ac. Dans le cas des approches utilisant des esters NHS, la liaison se fait aux amines primaires des Ac qui sont réparties dans toute leur structure. On parle donc de fonctionnalisation non orientée car la position du site de liaison sur les Ac est aléatoire et les domaines Fab peuvent ainsi être liés aux NPs. C'est pourquoi le protocole Hydrazide, spécifique au domaine Fc des Ac, présentait un intérêt particulier. Les trois procédures ont été adaptées pour des NPs d'or (AuNPs) sphérique de 100 nm de diamètre et celles-ci ont été caractérisées par des mesures des spectres d'absorbance, de la taille hydrodynamique, du potentiel zêta ainsi que des techniques d'imageries et de dosage à l'aide d'Ac conjugués à des fluorophores. Tous ces résultats ont mené à la conclusion que le protocole EDC/NHS effectué à pH 7 était le plus robuste et assurait la plus grande couverture en Ac sur les NPs.

Une fois la fonctionnalisation maîtrisée, la seconde partie de ce mémoire présentera comment utiliser ces NPs pour évaluer quantitativement l'expression de certains antigènes (CD44, HER2 et CD24) sur trois lignées cellulaires de cancer du sein (MDA-MB-231, MDA-MB-453 et BT-474). La méthode développée dans ce projet de maîtrise présente la nouveauté d'in-

cuber les cellules en suspension et non plus en pétri comme dans les modèles de marquage bidimensionnels classiques. Les résultats de l'immunomarquage avec les AuNPs (immunoplasmonique) sont directement comparés aux résultats d'immunofluorescence pour la quantification des antigènes. Une bonne corrélation a été trouvée entre les deux tests pour les MDA-MB-231 (tous antigènes confondus) et pour les MDA-MB-453 (excepté pour le CD24). Les BT-474 ont démontré des résultats incohérents avec l'immunofluorescence avec un faible nombre de nanoparticules par cellules pour tous les antigènes. Les expériences d'immunoplasmoniques ont également été réalisées en présence de sérum humain et les mêmes tendances ont été observées.

Au vu de ces résultats, il est recommandé pour de futures études de se pencher sur l'optimisation des techniques de purification des AuNPs fonctionnalisées ainsi que sur le développement d'un contrôle qualité pour mesurer l'activité des anticorps. Aussi, en vue d'une standardisation des procédés, il faudrait augmenter le nombre de AuNPs par cellules pour réduire la variabilité de la mesure.

ABSTRACT

Breast cancer accounts for 25% of all cancer cases diagnosed in women in Canada. Nowadays, the most effective way to diagnose breast cancer is to perform a biopsy of the suspect area in the patient and analyze it in laboratory. The gold standard used by pathologists to determine whether the tissue is cancerous or not is immunohistochemical staining (IHC). This method has several disadvantages, such as the possible degradation of targeted antigens due to the use of fixating agents (Formalin, etc.) or the difficulty of targeting several antigens in the same sample. In this project will be presented a way to address these problems by using functionalized nanoparticles (NP) with antibodies (Ab) to specifically target breast cancer cells. In addition to high stability that avoids the use of fixating agents before labelling the cells, biocompatible NPs have special optical properties that make it easy to visualize and to count. The ultimate goal of this work is to develop and test a robust protocol that can be applied directly by pathologists in Canada and show results capable of competing with IHC.

The first part of the thesis will be about the functionalization of NPs and their characterization. Three functionalization approaches were tested: EDC/(Sulfo-)NHS (*N*-3-(*dimethyl-amino*)propyl-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride/*N*-Hydroxy(*sulfo*)succinimide), NHS and Hydrazide. These names refer to the functional group that binds to the Ab. In the case of approaches using NHS esters, the binding is to the primary amines of the Ab which are distributed throughout their structure. We therefore speak of non-oriented functionalization because the position of the binding site on the Ab is random and the Fab domains can thus be bound to NPs. This is why the Hydrazide protocol, specific to the Fc domain of Ab, was of particular interest. The three procedures were adapted for 100 nm diameter spherical gold nanoparticles (AuNPs) and these were characterized by measurements of absorbance spectra, hydrodynamic size, zeta potential, and imaging and assay using Ac conjugated to fluorophores. All these results led to the conclusion that the EDC/NHS protocol performed at pH 7 was the most robust and provided the greatest coverage of Ab on NPs.

Once the functionalization is under control, the second part of this thesis will present how to use these NPs to quantitatively evaluate the expression of certain antigens (CD44, HER2 and CD24) on three breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-453 and BT-474). The method developed in this master's project presents the novelty of incubating suspended cells and no longer kneading them as in conventional two-dimensional marking models. The results of immunolabeling with AuNPs (immunoplasmonic) are directly compared with immunofluorescence results for the quantification of antigens. A good correlation was found

between the two tests for MDA-MB-231 (all antigens combined) and for MDA-MB-453 (except for CD24). BT-474 demonstrated inconsistent results with immunofluorescence with a very low number of nanoparticles per cell for all antigens. Immunoplasmonic experiments were also performed in the presence of human serum and the same trends were observed.

In view of these results, it is recommended for future studies to focus on the optimization of purification techniques for functionalized AuNP as well as the development of quality control to measure antibody activity. Also, in order to standardize processes, the number of AuNPs per cell should be increased to reduce the variability of the measurement.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	iv
ABSTRACT	vi
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xv
LISTE DES ANNEXES	xvi
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	3
2.1 Définitions et concepts de base	3
2.1.1 Nanoparticules plasmoniques	3
2.1.2 Cellules, antigènes et anticorps	5
2.2 Le cancer du sein	7
2.2.1 Anatomie du sein et développement du cancer	7
2.2.2 Méthodes de diagnostic actuelles	8
2.2.3 Lignées cellulaires et hétérogénéité du cancer	11
2.3 Fonctionnalisation de nanoparticules plasmoniques	13
2.3.1 Stratégies biochimiques	13
2.3.2 Compromis entre quantité et qualité	17
2.4 Application biomédicale : la biodétection	19
2.4.1 Interaction nanoparticules/cellules	20
2.4.2 Imagerie	21
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIES EXPÉRIMENTALES DE FONCTIONNALISA- TION DE NANOPARTICULES PLASMONIQUES	23
3.1 PEGylation	23

3.1.1	Courbes de calibration	23
3.1.2	Variation du temps d'incubation	24
3.2	Protocoles de fonctionnalisation avec des anticorps	24
3.3	Caractérisation	27
3.3.1	Spectres d'absorbance	27
3.3.2	Dynamic Light Scattering (DLS)	27
3.3.3	Surface Plasmon Resonance (SPR)	28
3.3.4	Imagerie des nanoparticules fonctionnalisées	29
3.3.5	Quantification du nombre d'anticorps par nanoparticule	30
CHAPITRE 4 RÉSULTATS DE LA FONCTIONNALISATION DE NANOPARTICULES		
	PLASMONIQUES	31
4.1	Étude de la PEGylation	31
4.2	Fonctionnalisation via EDC/Sulfo-NHS	36
4.2.1	Étude préliminaire : détermination du pH optimal pour l'attachement d'anticorps par Surface Plasmon Resonance	36
4.2.2	Spectres	36
4.2.3	Taille et potentiel zeta	37
4.2.4	Imagerie des nanoparticules fonctionnalisées	39
4.3	Comparaison à d'autres stratégies de fonctionnalisation	40
4.3.1	Caractérisation	40
CHAPITRE 5 IMMUNOMARQUAGE <i>IN VITRO</i> À L'AIDE DE NANOPARTICULES		
	PLASMONIQUES	47
5.1	Présentation des lignées cellulaires et des anticorps utilisés	47
5.2	Détermination des conditions expérimentales	48
5.2.1	Intéraction des nanoparticules avec du sérum humain	48
5.2.2	Préparation des échantillons	49
5.2.3	Imagerie	51
5.3	Résultats	53
5.3.1	Modélisation de la sédimentation des nanoparticules dans un pétri de cellules adhérentes	53
5.3.2	Intéraction nanoparticules/sérum humain	55
5.3.3	Immunoplasmonique et immunofluorescence	58
CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE		
		62

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATION	66
7.1 Synthèse des travaux	66
7.2 Améliorations et travaux futurs	66
RÉFÉRENCES	69
ANNEXES	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Résumé des stratégies de fonctionnalisation de nanoparticules d'or avec des anticorps, en gras sont mises en évidence les liaisons non-covalentes.	14
Tableau 2.2	Résumé comparatif de trois méthodes d'imagerie permettant l'imagerie des échantillons de cellules porteuses de nanoparticules.	22
Tableau 4.1	Quantification du rendement de la fonctionnalisation en terme d'anticorps par nanoparticules. Valeurs calculées à partir des mesures d'intensités en fluorescence.	44
Tableau 5.1	Résumé de l'expression de CD44, HER2 et CD24 dans 3 lignées cellulaires tel que trouvé dans la littérature.	48
Tableau 5.2	Position du pic plasmon pour trois types de nanoparticules, avec ou sans PEG, incubées dans différentes concentrations de sérum humain (HS).	56
Tableau 5.3	Résumé des expressions de CD44, HER2 et CD24 dans 3 lignées cellulaires telles que mesurées en immunofluorescence.	58
Tableau 6.1	Comparatif qualitatif des trois approches de fonctionnalisation adaptées et testées dans ce projet.	62

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1	Échelle représentant divers objets et leurs ordres de grandeur par rapport au nanomètre.	3
Figure 2.2	Schéma d'une cellule présentant des antigènes comportant des épitopes différents.	5
Figure 2.3	Schéma représentatif d'un sein et de ses composantes chez une personne saine.	7
Figure 2.4	Schéma explicatif du procédé d'immunohistochimie.	9
Figure 2.5	Ciblage de l'antigène HER2 par IHC sur un tissu de carcinome canalaire (Human Protein Atlas)	10
Figure 2.6	À gauche : schéma de la structure anticorps (Source : BioRad). À droite : illustration des fonctionnalisations sans agent de réticulation, par interactions faibles ou hydrophobes (A), par interactions électrostatiques (B) et par liaisons datives (C).	15
Figure 2.7	Schéma du protocole de fonctionnalisation EDC/Sulfo-NHS	16
Figure 2.8	Schéma du protocole de fonctionnalisation NHS	16
Figure 2.9	Schéma du protocole de fonctionnalisation Hydrazide	17
Figure 2.10	Schéma de l'ELISA avec signal augmenté grâce à des AuNPs. (Source : Billingsley & al.)	19
Figure 2.11	Description schématique des trois techniques d'imagerie comparées. .	21
Figure 3.1	Image d'une cellule de mesure DLS et des charges en présence pour la mesure du potentiel zêta (Source : Malvern).	27
Figure 3.2	Schéma représentatif de l'étude SPR. Activation du dextran avec EDC/NHS (1.), injections d'anti-HER2 (2.) et lavage avec tampon de migration (3.).	29
Figure 4.1	Courbes SPR de la PEGylation d'une puce d'or à différents pH. Injections de 30 minutes.	31
Figure 4.2	Réponse relative environ 3 minutes après la fin de l'injection de SH-PEG _{5kDa} ou OH-PEG _{5kDa} à différents pH pendant 30 min.	32
Figure 4.3	Courbes de calibration de nanoparticules d'or commerciales, avec ou sans PEG, dans l'eau (a) ou du milieu de culture supplémenté de FBS (b).	33

Figure 4.4	Effet du temps d'incubation lors de la PEGylation de nanoparticules d'or de 100nm sur le pic plasmon, le diamètre hydrodynamique et le potentiel zêta. Le temps initial correspond au contrôle sans ajout de PEG.	34
Figure 4.5	Indice de polydispersité des échantillons de nanoparticules d'or de 100nm incubés avec du mPEG-SH durant différents temps d'incubation. . . .	35
Figure 4.6	Réponse relative mesurée environ 3 minutes après 3 injections d'anticorps anti-HER2 sur une puce d'or couverte de Dextran.	37
Figure 4.7	Spectres dans l'UV et le visible de AuNPs de 100 nm de diamètre fonctionnalisées avec du PEG et/ou 3 anticorps différents.	38
Figure 4.8	Résultats des mesures par <i>Dynamic Light Scattering</i> . Les valeurs du test statistique sont données par rapport à l'échantillon de AuNP-citrate sauf si spécifié autrement (** p=0,01).	39
Figure 4.9	Images de microscopie à rétrodiffusion (en rouge) et en fluorescence (en vert) de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec anti-CD44 (FITC). Les points blancs des deux dernières images résultent de la colocalisation des nanoparticules avec la fluorescence. Les couleurs ont été ajoutées artificiellement.	40
Figure 4.10	Spectres de nanoparticules fonctionnalisées selon 3 protocoles différents.	41
Figure 4.11	Caractérisation par DLS de nanoparticules d'or de 100nm fonctionnalisées selon des protocoles différents.	41
Figure 4.12	Schéma du modèle théorique pour la quantification du nombre maximal anticorps par nanoparticules selon leur orientation.	43
Figure 4.13	Quantification du nombre d'anticorps par AuNPs avec la courbe de calibration de FITC en présence de AuNPs et les spectres des nanoparticules fonctionnalisées.	45
Figure 5.1	Schéma explicatif de la procédure d'immunomarquage des cellules en suspension à partir d'une culture cellulaire adhérente	50
Figure 5.2	Schéma illustrant le test d'immunofluorescence indirecte avec les deux contrôles négatifs utilisés dans le projet.	51
Figure 5.3	Comparaison d'images prises suivant deux types d'imageries. Échantillon : AuNPs-PEG-anti CD44 sur des MDA-MB-231.	52
Figure 5.4	Schéma du processus de sédimentation de AuNPs fonctionnalisées lors de l'incubation dans un pétri de cellules. Différentes données sont illustrées : H = hauteur, D = diamètre et t = temps d'incubation.	54

Figure 5.5	Taille et potentiel zeta mesuré par DLS pour différentes nanoparticules fonctionnalisées ou non avec du PEG et incubées avec du sérum humain à deux concentrations différentes.	56
Figure 5.6	Spectres de nanoparticules avec ou sans PEG après 1h d'incubation avec du sérum humain (HS) à deux concentrations différentes.	57
Figure 5.7	Immunofluorescence et Immunoplasmonique sur les 3 lignées cellulaires étudiées. Les barres noires sur les images (b-d) représentent les échantillons incubés avec du sérum humain. (* $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$) . . .	59
Figure 5.8	Images représentatives de l'essai d'immunofluorescence sur les MDA-MB-453 (A-D), MDA-MB-231 (E-H) et les BT-474 (I-L). De gauche à droite, les colonnes correspondent au contrôle négatif 1 puis au ciblage du CD44, du HER2 et du CD24 respectivement.	60
Figure 5.9	Images représentatives de l'essai d'immunoplasmonique en l'absence de serum humain. Contrôles avec des AuNPs-PEG-COOH (A-C-E), AuNPs-PEG-anti CD44 (B), AuNPs-PEG-anti HER2 (D) et AuNPs-PEG-anti CD24 (F).	61
Figure 6.1	Essai d'immunofluorescence sur les MDA-MB-231 à faible nombre de passage cellulaire.	64
Figure A.1	Imagerie des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec un IgG chèvre anti-lapin (Cy3) selon le protocole NHS. Les couleurs sont ajoutées artificiellement avec le logiciel Fiji.	75
Figure A.2	Imagerie des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec un IgG chèvre anti-lapin (Alexa Fluor 488) selon le protocole Hydrazide. Les couleurs sont ajoutées artificiellement avec le logiciel Fiji.	76

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorps
AuNP	Nanoparticule d'or
BSA	Bovine Serum Albumin
CTCF	Corrected Total Cell Fluorescence
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EDC	N-3-(diméthylamino)propyl-N-éthylcarbodiimide hydrochloride
FBS	Fetal Bovine Serum
IF	Immunofluorescence
IHC	Immunohistochimie
IP	Immunoplasmonique
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NP	Nanoparticule
PB	Phosphate Buffer
PBS	Phosphate Buffer Saline
PEG	Polyéthylène Glycol
PS	Pénicilline/Streptomycine

LISTE DES ANNEXES

Annexe A	IMAGERIE EN FLUORESCENCE DES NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISÉES AVEC LES PROTOCOLES NHS ET HY- DRAZIDE	75
----------	--	----

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Le cancer du sein est le cancer le plus courant chez les femmes et une canadienne sur huit sera atteinte d'un cancer du sein au cours de sa vie [1]. Le Canada n'est cependant pas le pays le plus touché car c'est la Belgique qui possède le plus haut taux de cancer du sein, d'où l'intérêt particulier de l'auteure sur ce sujet [2]. La problématique liée au cancer du sein repose sur deux piliers : le diagnostic et le traitement. Une grande partie de la recherche est basée sur la découverte du meilleur traitement ou du médicament capable "d'éradiquer" le cancer. En attendant de trouver cette solution miracle, si seulement elle existe, du travail reste à faire pour améliorer les procédures de diagnostic qui permettent la détection puis le choix du traitement le plus adapté. Actuellement, la méthode de diagnostic la plus efficace est de réaliser une biopsie chez le patient qui présente une masse suspecte et d'analyser l'échantillon en laboratoire. Une biopsie consiste à prélever un échantillon de tissu ou de cellules à l'aide d'une longue aiguille de diamètre plus ou moins grand selon le type de biopsie (au trocart ou à aiguille fine). Ces morceaux de tissus sont alors traités et analysés par des pathologistes qui déterminent la nature de ces cellules. Leur technique standard pour l'évaluation des biomarqueurs est l'immunohistochimie (IHC) qui consiste à fixer les tissus, en découper de fines sections et ensuite à les incuber avec des anticorps de détection ciblant certains marqueurs typiques chez les cellules cancéreuses afin de les mettre en évidence par colorimétrie. Cette technique est peu coûteuse mais présente de nombreux désavantages que les chercheurs aimeraient contourner. D'une part, l'utilisation d'agents fixateurs dans la préparation des échantillons dégrade certains récepteurs, les rendant impossible à détecter, ce qui complique l'analyse. D'autre part, puisque les tests sont réalisés sur des coupes de tissus et que chaque coupe est ciblée avec des anticorps différents scrupuleusement choisis, le diagnostic établi par le pathologiste sera influencé par son interprétation des résultats section par section afin de déduire le statut du tissu au complet. Cette part de subjectivité est également un enjeu à dépasser avec une méthode intrinsèquement moins équivoque [3].

Afin de trouver une solution complémentaire et/ou alternative à l'IHC, le domaine des nanotechnologies offre de nombreuses possibilités pouvant répondre aux enjeux biomédicaux présentés précédemment. En particulier, les nanoparticules (NPs) plasmoniques, typiquement en or, argent ou alliages des deux, présentent l'avantage d'être beaucoup moins photosensibles que les fluorophores et sont plus facilement quantifiables que les chromophores utilisés en colorimétrie. Le terme plasmonique sera expliqué dans la première partie de ce rapport et fait référence aux propriétés optiques remarquables des NPs, qui leur donne une couleur

spécifique en fonction de leur taille et de leur composition et permet de les observer aisément. Ainsi, il est également possible de distinguer des NPs différentes selon leur couleur et permettre ce qu'on appelle le multiplexage : marquer différents antigènes sur les cellules avec différentes nanoparticules et rassembler toute l'information dans un seul échantillon.

Par ailleurs, leur faible cytotoxicité permet de les appliquer sur des cellules vivantes et il est possible de les conjuguer à des anticorps afin de les rendre spécifiques aux cellules cancéreuses. C'est ce qu'on appelle la fonctionnalisation et c'est une étape essentielle dans ce projet. La biocompatibilité des nanoparticules n'est cependant pas un aspect critique dans le cadre de cette maîtrise puisque la viabilité des cellules durant le processus de marquage n'est pas une condition absolue pour le succès du diagnostic. C'est pourquoi la cytotoxicité des nanoparticules utilisées ne sera pas testée dans ce projet mais d'autres applications avec ces nanoparticules sont actuellement en cours d'essai cliniques [4]. L'objectif principal est de concevoir un protocole d'immunomarquage de cellules de cancer du sein *in vitro* à l'aide de nanoparticules plasmoniques fonctionnalisées. Il faut d'abord trouver une méthode de fonctionnalisation efficace et reproductible, capable de s'appliquer à divers types de NPs et convenir aux anticorps. Ensuite, il faut caractériser les NPs et s'assurer que la fonctionnalisation n'affecte pas leurs propriétés optiques essentielles à leur détection en microscopie. Une fois ces étapes maîtrisées, il faut établir un protocole de marquage sur des cellules vivantes à l'aide de ces NPs et comparer le résultat à une méthode standard, ici l'immunofluorescence (technique semblable à l'IHC qui utilise des fluorophores à la place des enzymes). Cette technique a été choisie pour sa simplicité d'application pour des étudiants non spécialistes en pathologie et en fonction des équipements disponibles dans le laboratoire.

Dans ce mémoire de maîtrise, une revue de littérature sur le cancer du sein et les travaux réalisés avec des nanoparticules sera présentée au chapitre 2. Ensuite, la méthodologie et les résultats des expériences seront découpés en deux parties : la première sur la fonctionnalisation des nanoparticules au chapitre 4 et la deuxième sur le marquage des cellules au chapitre 5. Enfin, ces résultats seront discutés au chapitre 6 et les conclusions du projet seront données au dernier chapitre. Des images complémentaires peuvent être consultées à l'annexe A.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Définitions et concepts de base

2.1.1 Nanoparticules plasmoniques

Afin de comprendre la solution proposée dans ce projet, il est essentiel de présenter certains concepts. La base du travail repose sur l'utilisation des nanoparticules (NPs) plasmoniques et cette section a pour but de les définir et d'exposer certaines de leurs propriétés qui en font des candidates parfaites pour des applications dans le domaine biomédical.

Définitions et propriétés optiques

Les dimensions des NPs varient de un à quelques centaines de nanomètres et elles peuvent être composées de polymères, de lipides ou de métaux tel qu'illustré à la figure 2.1. Plus particulièrement, les nanoparticules métalliques ont des propriétés remarquables lorsqu'elles interagissent avec la lumière ; on parle alors de nanoparticules plasmoniques.

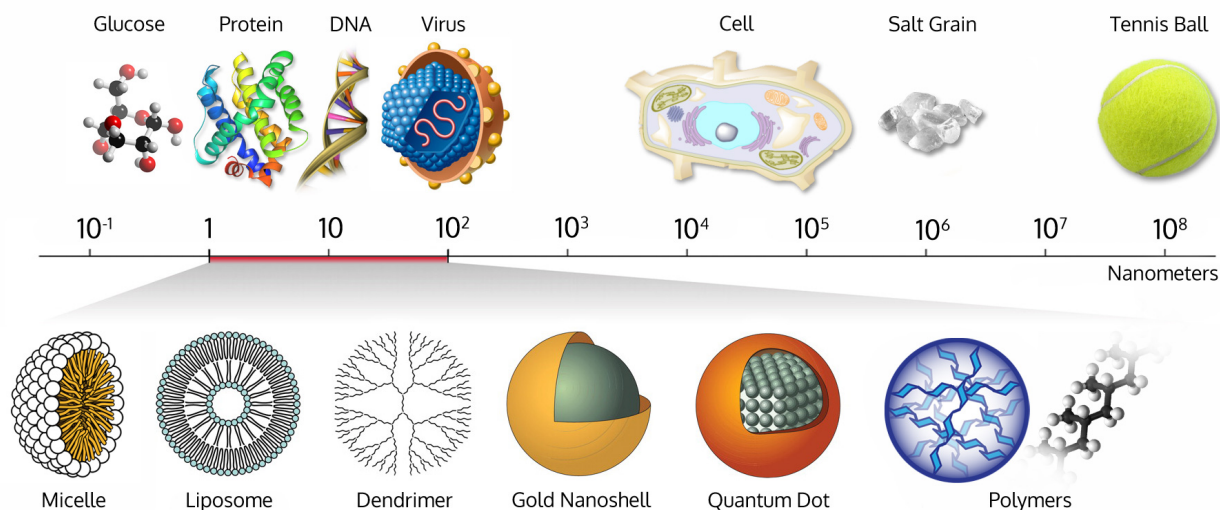


Figure 2.1 Échelle représentant divers objets et leurs ordres de grandeur par rapport au nanomètre [5].

L'une des caractéristiques importantes des NPs est qu'elles ont un spectre d'absorbance

avec un pic (ou deux pics dans le cas des nanobâtons) d'extinction situé dans le visible ou le proche infrarouge et que ce pic est sensible au changement d'indice de réfraction à la surface des NPs. Ce pic plasmon est dû aux oscillations du gaz d'électrons libres (appelés plasmons) en surface. Ces oscillations entrent en résonance à certaines longueurs d'onde et ont pour effet d'augmenter l'absorption et la diffusion de la lumière. Pour des diamètres de NPs suffisamment petits (<20 nm), on se trouve dans une approximation dipolaire et la position du pic ne varie pas avec la taille et est donnée par l'approximation suivante :

$$\omega = \sqrt{\frac{\omega_p^2}{\varepsilon_\infty + 2\varepsilon_m} - \frac{1}{\tau^2}} \quad (2.1)$$

Où $\omega_p = \sqrt{\frac{n e^2}{m \varepsilon_0}}$ est la fréquence plasmon de volume et est constante pour un matériau donné, ε_∞ est une correction du modèle de Drude, sur la partie réelle de la permittivité du matériau, qui tient compte des transitions interbandes à hautes énergies, ε_m est la permittivité relative du milieu et τ est le temps de libre parcours moyen des électrons. Cette condition de résonance suppose que la partie imaginaire de la fonction diélectrique du matériau est négligeable et on peut retrouver la longueur d'onde du pic (λ) avec la formule suivante : $\omega = 2\pi c/\lambda$ où c est la vitesse de la lumière.

Ainsi si l'indice de réfraction local augmente ($\varepsilon_m \nearrow$), la position du pic plasmon se déplace vers le rouge (longueurs d'onde plus hautes) ou inversement vers le bleu (longueurs d'onde plus faibles). Cette relation n'est plus valable pour des NPs plus grandes que 20 nm et la théorie de Mie [6] doit être utilisée pour rendre compte de l'influence de la taille sur le pic plasmon¹.

Ainsi, la position, la largeur et l'intensité du pic plasmon sont modulables avec la taille et la composition des NPs ; il est donc crucial de connaître ces informations avant de pouvoir en déterminer la concentration par spectroscopie. En effet, l'intensité du pic plasmon est proportionnelle à la concentration en NPs, ce qui donne la possibilité de faire des courbes de calibration afin de déterminer la concentration d'un échantillon ou de la déterminer analytiquement à partir de la théorie de Mie pour des NPs d'or, d'argent et d'alliages [7, 8]. Il est important de retenir que les modifications en surface des NPs, des changements dans le milieu ou des phénomènes d'agglomérations auront un impact sur le pic plasmon. En mesurant précisément ces changements, ces informations peuvent être des outils puissants pour prédire et comprendre ce qui se passe à proximité des NPs.

1. Pour les lecteurs intéressés je recommande la lecture du chapitre 4 du livre de C. Bohren et D. Huffman intitulé *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* [6].

Grâce à cette caractéristique, les nanoparticules ont suscité un intérêt grandissant durant les 30 dernières années dans le domaine biomédical. Notamment dans les domaines du diagnostic et du traitement du cancer. Certaines applications sont décrites au chapitre 2 mais dans la plupart des cas, on utilise les NPs comme moyens de détection grâce à des essais colorimétriques, changement de couleur suite à une agglomération, observation au microscope grâce à leur grande capacité de diffusion de la lumière ou pour participer aux traitements (par ex. hyperthermie).

2.1.2 Cellules, antigènes et anticorps

Le deuxième concept important qu'il faut décrire avant de rentrer dans le vif du sujet est le complexe antigène-anticorps. Cette section fera également un bref rappel sur les notions concernant les cellules eucaryotes qui seront considérées comme acquises durant la suite de ce mémoire.

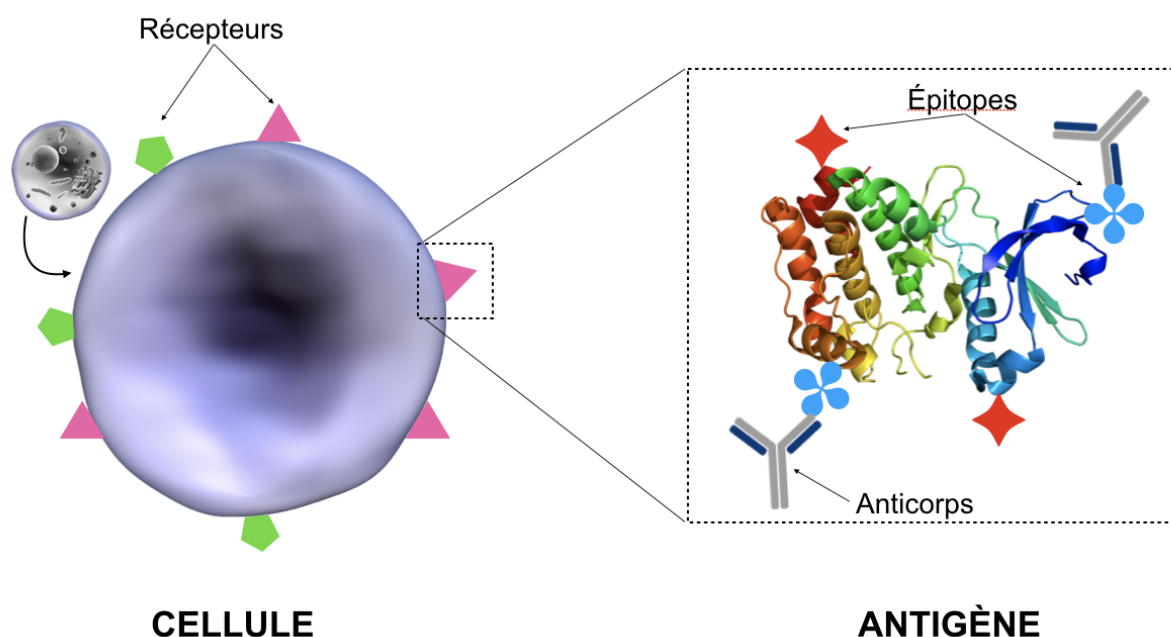


Figure 2.2 Schéma d'une cellule présentant des antigènes comportant des épitopes différents.

La figure 2.2 résume les faits saillants sur le rapport entre les cellules et les anticorps. Soit une cellule eucaryote quelconque, étrangère à notre système immunitaire et potentiellement

dangereuse. Cette cellule est composée d'un noyau renfermant son code génétique (ADN) baignant dans un cytoplasme qui contient d'autres organelles nécessaires à son bon fonctionnement et sa survie, le tout est entouré d'une membrane composée d'une double couche lipidique (hydrophile de part et d'autre) chargée négativement en surface. Cette membrane contient également toute une série de protéines exerçant diverses fonctions. Certaines d'entre elles sont des récepteurs qui permettent d'ancrer d'autres molécules comme des anticorps. Plus particulièrement, on appellera antigène un récepteur cellulaire qui peut être reconnu par un anticorps spécifique. La structure type des anticorps est schématisée plus loin à la figure 2.6

Les antigènes, comme les protéines, sont composés de différents domaines dont certains sont appelés des épitopes. **Chaque anticorps est destiné à reconnaître un épitope de l'antigène.** C'est important à retenir pour comprendre les résultats obtenus dans ce projet car cela veut dire que si l'antigène change de conformation ou subit une mutation, certains épitopes peuvent devenir inaccessibles voire être modifiés et donc ne plus être reconnus par leur anticorps associé. Ces épitopes sont la raison de l'émergence de deux grandes classes d'anticorps produits commercialement : les monoclonaux et les polyclonaux. Les anticorps monoclonaux sont issus de cellules "parents" isolées et sont tous spécifiques au même épitope sur l'antigène tandis que les polyclonaux se composent de plusieurs clones distincts et cette "soupe" d'anticorps peut reconnaître plusieurs épitopes du même antigène [9]. Les anticorps monoclonaux ou polyclonaux font partie des anticorps dits primaires, à distinguer des anticorps secondaires qui se lient aux anticorps primaires et non aux antigènes présents à la surface de la cellule [10].

À présent, les fondations sont posées pour comprendre la problématique et le contenu de ce mémoire. La section suivante sera consacrée à un aperçu général des méthodes actuelles de diagnostic du cancer du sein et des travaux effectués récemment pour utiliser les nanoparticules dans des applications biomédicales de détection et de diagnostic.

2.2 Le cancer du sein

Le cancer du sein est une anomalie pathologique des cellules épithéliales des canaux mammaires, il touche quasi intégralement les femmes car les hommes ont des seins bien moins développés. Cependant, le risque n'est pas nul chez les hommes et en 2017 on estime à 230 le nombre de nouveaux cas diagnostiqués chez les hommes au Canada. Pour les femmes, le cancer du sein représente un quart des cas de cancer diagnostiqués au Canada [1]. Cette section explique la problématique du cancer du sein et de son diagnostic. Les techniques de diagnostic standards et leurs inconvénients sont ainsi présentés.

2.2.1 Anatomie du sein et développement du cancer

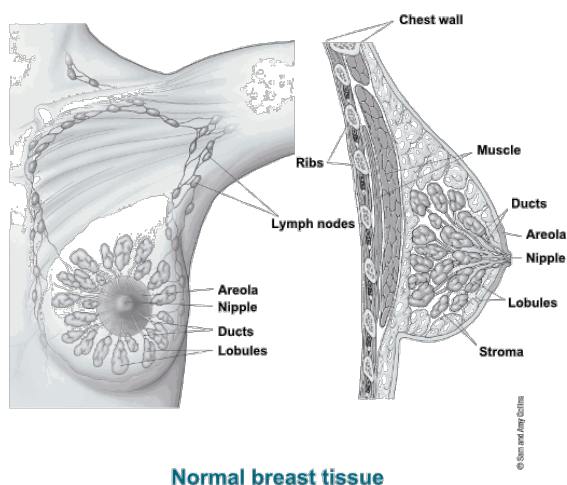


Figure 2.3 Schéma représentatif d'un sein et de ses composantes chez une personne saine [11].

Les seins sont déposés sur le muscle pectoral et sont principalement composés de graisse et de lobules aussi appelés *alvéoles*. Ces lobules sont responsables de la production de lait durant la grossesse et l'acheminement du lait au mamelon via les canaux (*ducts* en anglais, cfr. figure 2.3). On parle de carcinome canalaire ou lobulaire selon que le cancer se forme dans les canaux ou dans les cellules tapissant les lobules [1]. Celui-ci peut également envahir et infiltrer les tissus avoisinant et former éventuellement des métastases dans d'autres parties du corps. Il existe d'autres types de cancer du sein plus rares, comme la maladie de Paget par exemple, mais la majorité des cancers diag-

nostiqués naissent et se développent dans les cellules épithéliales des canaux mammaires.

Lorsqu'une masse est palpable dans le sein elle peut correspondre à une tumeur bénigne (un kyste par ex.) ou une tumeur maligne. Dans ce dernier cas, cela signifie que le cancer est envahissant et qu'il s'est propagé depuis les lobules ou les canaux vers les tissus voisins. En effet, les cancers *in situ* sont trop petits pour être détectables au toucher et ils ne sont mis en évidence qu'après d'autres tests de dépistage comme la mammographie (cfr. section 2.2.2).

2.2.2 Méthodes de diagnostic actuelles

Cette section présente les principales techniques diagnostiques et de dépistage disponibles mais n'est pas une liste exhaustive de toutes les possibilités. Un patient va généralement subir un ou plusieurs tests pour établir le diagnostic d'un cancer du sein : masse palpable dans les seins, foie augmenté de volume ou des ganglions lymphatiques palpables au niveau des aisselles. Certains tests comme la mammographie peuvent être réalisés régulièrement pour le dépistage des lésions asymptomatiques. Chez certaines personnes ayant des antécédents médicaux qui suggèrent un risque accru de développer ce type de cancer, le médecin traitant pourra prescrire des tests plus poussés [12].

Mammographie

La mammographie permet dépister et diagnostiquer un cancer du sein chez la femme ou l'homme. Des rayons X sont envoyés à faible dose pour obtenir une image du sein. La mammographie diagnostique fait généralement suite à une mammographie de dépistage anormale. Parmi les anomalies recherchées : calcifications, de masses ou densité asymétrique. Comme dans la plupart des tests diagnostiques, la mammographie peut donner des résultats faux-négatifs ou faux-positifs. La survenue des faux négatifs est estimée à 20% ; cela peut avoir un impact négatif en raison du retard pour l'établissement du diagnostic. Dans le cas des faux positifs, des tests supplémentaires, comme ceux décrits ci-dessous, sont réalisés afin de confirmer ou d'infirmer le résultat.

Échographie

Cette technique se sert d'ultrasons et du principe d'écho-localisation (oui, comme les chauves-souris) pour prendre une image du sein. L'avantage de l'échographie est qu'elle permet de différencier les kystes des tumeurs qui nécessitent des tests supplémentaires afin de déterminer s'il s'agit de cancer ou non. Elle permet aussi de faciliter le guidage lors de la biopsie.

Biopsie

Il existe plusieurs types de biopsies mais dans tous les cas il s'agit de prélever un échantillon de tissu ou de cellules dans la zone suspectée cancéreuse chez le patient afin que des pathologistes puissent l'analyser en laboratoire. Certaines biopsies, comme la biopsie chirurgicale ou au trocart, sont plus invasives que d'autres et la moins invasive est l'aspiration par aiguille fine. Comme son nom l'indique, elle consiste à introduire une longue et très fine aiguille dans la zone potentiellement cancéreuse chez le patient. Bien que la procédure soit très rapide et que

plusieurs échantillons peuvent être prélevés, puisque l'aiguille est très fine il y a un risque de passer à côté de la tumeur et d'obtenir un diagnostic négatif malgré la présence de cancer [13].

Analyses en laboratoire

Les échantillons récupérés sont transmis à des pathologistes qui les analyseront en laboratoire pour déterminer la nature du tissu. L'étalon d'or pour l'évaluation de l'expression de certains récepteurs sur des tissus cytopathologiques est l'immunohistochimie (IHC) ; où le choix des marqueurs est d'une importance capitale et varie selon chaque type de cancer [3]. Le principe est illustré à la figure 2.4 et est composé des étapes suivantes [14] :

- I. Fixation des tissus dans de la formaline et enrobage dans des blocs de paraffine.
- II. Confection de coupes minces de paraffine sur toute l'épaisseur du tissu.
- III. Adhésion des coupes de paraffine sur une lamelle de verre et traitement de récupération des antigènes.
- IV. Détection des antigènes avec anticorps primaires puis anticorps secondaires conjugués avec une enzyme (ex. peroxydase). Changement de couleur obtenu après l'ajout du substrat (ex. 3,3' Diaminobenzidine (DAB)) et contre-coloration des noyaux et de la membrane avec Hematoxyline/éosine.
- V. Application d'une résine et d'un mince couvercle de verre pour l'observation.
- VI. Observation au microscope en champ clair.

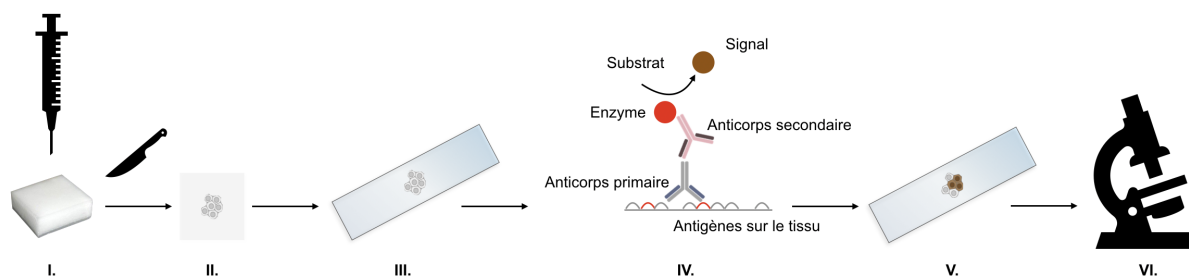
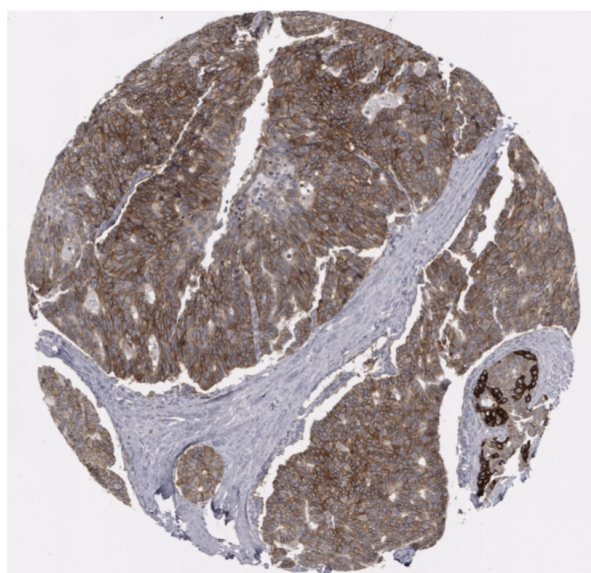


Figure 2.4 Schéma explicatif du procédé d'immunohistochimie.

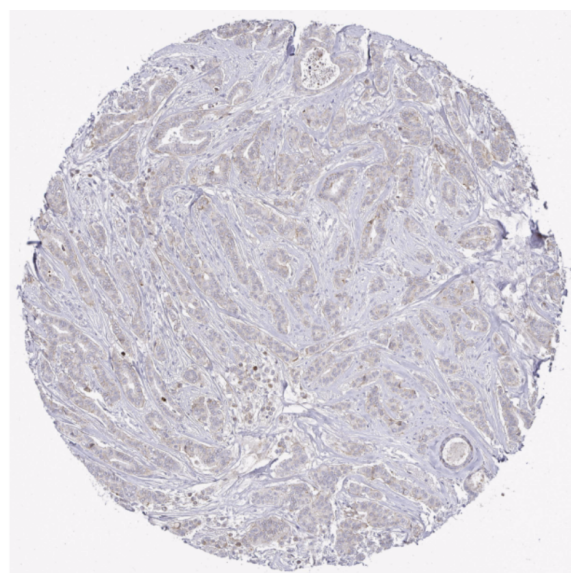
Une fois les échantillons marqués, les pathologistes évaluent le niveau d'expression de l'antigène ciblé selon l'intensité du signal détecté et le pourcentage de cellules colorées. Rappelons que dans cette méthode, un seul antigène est ciblé par section de tissu. La figure 2.5 est un exemple typique d'échantillons d'IHC, avec ici le ciblage de l'antigène HER2, qui peuvent être soit positifs (figure 2.5a) lorsqu'une forte expression de la protéine est détectée, soit négatifs

(figure 2.5b) lorsque la protéine est indétectable dans la grande majorité des cellules. L'IHC est une méthode économique, assez rapide mais qui comporte une part de subjectivité. En effet, il n'y a pas d'aspect quantitatif linéaire avec l'expression des antigènes puisque l'analyse du pourcentage de cellules colorées est réalisée visuellement par les pathologistes (ou de manière automatique par ordinateur) et que le niveau de coloration est décrit comme : absent, faible, moyen ou fort [15]. Aussi, le marquage des antigènes est effectué section par section, ce qui limite l'information sur la globalité du tissu et encore une fois, l'oeil expert du pathologiste est nécessaire pour juger et interpréter les résultats qui apparaissent comme équivoque. Il est nécessaire de pratiquer la méthode selon des procédures standardisées, avec des contrôles qualité rigoureusement appliqués, sinon des variations peuvent survenir dans les résultats obtenus d'un laboratoire à l'autre.

Parmi les limites de cette technique, il faut aussi tenir compte de la fixation des tissus qui pourrait modifier ou altérer les épitopes des antigènes et qui peut fausser les résultats. Il y a un besoin pour une nouvelle méthode de quantification du niveau d'antigène capable de rivaliser avec l'IHC tout en permettant le multiplexage [3].



(a) Tissu positif (Femme, 69 ans).



(b) Tissu négatif (Femme, 45 ans).

Figure 2.5 Ciblage de l'antigène HER2 par IHC sur un tissu de carcinôme canalaire (Human Protein Atlas) [15].

Afin de corroborer au résultat de l'IHC, un autre test est régulièrement effectué en laboratoire pour déterminer la quantité de gènes codants pour l'expression d'une certaine protéine.

En effet, derrière l'expression dérégulée de certains antigènes dans les cellules cancéreuses il peut y avoir une amplification des gènes spécifiques à ces antigènes ou à une séquence de ceux-ci (le gène codant pour HER2 par exemple). On utilise alors l'hybridation *in situ* en fluorescence (*FISH*, en anglais) qui sonde l'ADN ou l'ARN des cellules avec des séquences d'ADN conjuguées avec un fluorophore et complémentaires au gène d'intérêt.

Alternatives

D'autres techniques de diagnostic sont disponibles pour les patients en fonction des besoins cliniques. Pour des personnes ayant déjà été diagnostiquées d'un cancer du sein, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est parfois recommandée pour détecter la présence de cancer dans les autres organes ou dans l'autre sein. Ce test est rarement indiqué comme dépistage car il peut facilement produire des faux positifs malgré qu'il permette de distinguer des tumeurs qui ne sont pas visibles à la mammographie.

2.2.3 Lignées cellulaires et hétérogénéité du cancer

Le cancer du sein, comme beaucoup d'autres cancers, n'est pas homogène. Il existe une multitude de cellules différentes qui peuvent composer une tumeur de cancer du sein. La présence et la composition des cellules diffèrent d'un patient à l'autre mais il y a aussi de la variabilité dans une même tumeur. La première lignée cellulaire du cancer du sein a été établie il y a 60 ans [16] et depuis plus de 84 lignées cellulaires ont été répertoriées et classifiées [17]. L'hétérogénéité des tumeurs pose problème lorsqu'il s'agit d'établir un pronostic et trouver un traitement parfaitement adapté pour un patient. En effet, en fonction des récepteurs exprimés par les cellules, différents anticorps seront utilisés pour prédire la réponse des cellules à certains médicaments (i.e. l'expression des récepteurs hormonaux est corrélée avec la réponse à la thérapie hormonale).

Il est important de comprendre pourquoi cette hétérogénéité est un défi pour ce projet. Tout d'abord, la difficulté initiale réside dans le choix des lignées cellulaires qui seront utilisées pour la preuve de concept. Ce choix sera motivé principalement par l'expression relative de certains récepteurs. Dans la littérature, les lignées de cancer du sein sont classées principalement selon l'expression des récepteurs nucléaires d'oestrogènes (ER), de progestérone (PR) et du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) ; ce dernier récepteur transmembranaire est également appelé HER2/neu ou ErbB2. Parmi les lignées dites "triples négatives", une sous classe est caractérisée par la forte expression de CD44 (CD44⁺) et la faible expression de CD24 (CD24^{-/low}) qui correspond à un phénotype des cellules souches du cancer du sein [18].

Cependant, en cherchant davantage dans la littérature, une deuxième non-homogénéité se présente : une incohérence des résultats présentés dans les différentes études. Tels que présentés dans [17], certains profils moléculaires de lignées cellulaires diffèrent selon les papiers. Par exemple, les MDA-MB-453 sont HER2⁺ dans [16, 17] et HER2⁻ dans [19, 20]. Ces variations peuvent s'expliquer par des mutations génétiques qu'ont subies les cellules au fil du temps et suite aux passages cellulaires, mais aussi par les conditions expérimentales et de culture (milieu de culture, facteurs de croissance, stress, sensibilité du test, etc.). La phase du cycle cellulaire au moment de l'expérience a aussi son importance dans l'expression de certains récepteurs. Une attention particulière doit être portée à l'origine de ces différences lors de la sélection d'une lignée cellulaire du cancer du sein. De plus, les cellules doivent être pré-testées avec des méthodes standards (IHC, IF, FISH, etc.) afin de déterminer le statut des antigènes d'intérêts.

L'aspect médical et biologique du projet est extrêmement vaste et complexe et il est difficile de le résumer en ces quelques pages; toutefois il est crucial de comprendre les différents paramètres qui peuvent constituer des obstacles à l'utilisation des nanoparticules et trouver des moyens de les contourner, d'allier nanotechnologie et biotechnologie afin de proposer une solution alternative ou complémentaire aux techniques de diagnostic actuelles. Les sections suivantes présenteront les possibilités de modification des nanoparticules pour remplir les conditions nécessaires pour la réalisation de tels diagnostics.

2.3 Fonctionnalisation de nanoparticules plasmoniques

Cette section portera sur les nanoparticules plasmoniques et les différents moyens employés pour les rendre fonctionnelles en vue de leurs applications futures en biodétection décrites plus loin.

2.3.1 Stratégies biochimiques

Il existe de nombreuses façons de fonctionnaliser des nanoparticules, c'est-à-dire de les "rendre fonctionnelles". Par exemple, pour les applications *in vivo* il est souhaitable que les NPs soient solubles et biocompatibles. Pour cela, elles sont recouvertes d'un polymère hydrophile, le plus souvent, du polyéthylène glycol (PEG). Dans la plupart des cas, la fonctionnalisation de NPs est synonyme de conjugaison avec de l'ADN, des protéines ou des anticorps (Ac). Puisque les anticorps sont un type de protéines les techniques de fonctionnalisation sont essentiellement les mêmes. Cependant, dans le cas des anticorps, qui ont une région active destinée à la liaison spécifique avec un antigène (cfr. figure 2.6), il est préférable de choisir des stratégies qui impactent le moins possible l'activité de l'anticorps. Différentes méthodes de fonctionnalisation d'anticorps sur des NPs plasmoniques rapportées dans la littérature figurent dans le tableau 2.1 ; certaines nécessitent l'utilisation d'un agent de réticulation qui sert d'intermédiaire entre la NP et l'anticorps. Cet agent peut être composé uniquement de groupes moléculaires fonctionnels (i.e. le réactif de Traut) ou contenir un polymère entre les groupes fonctionnels (i.e. thiol-PEG-acide carboxylique). Parfois plusieurs agents de réticulation différents sont utilisés pour conjuguer d'un côté les nanoparticules et de l'autre les anticorps, puis de lier les extrémités libres sur chacun des agents. Cette liste n'est pas exhaustive mais contient les méthodes les plus courantes.

Dans les protocoles de conjugaison sans agent de réticulation (*crosslinker* en anglais), les anticorps sont ajoutés directement dans les solutions de NPs et peuvent se lier de manière covalente ou non. Les méthodes non-covalentes (interactions faibles, électrostatiques ou hydrophobes) ont l'avantage d'être faciles à préparer mais elles ne sont pas très efficaces. En effet, les étapes de purification pour enlever les Ac non attachés aux NPs peuvent également détacher les Ac faiblement liés ou encore, ceux-ci peuvent être déplacés par d'autres molécules ou protéines qui se trouvent en solution. C'est pourquoi on préfère les liaisons covalentes. La plus simple est la liaison dative (liaison covalente de coordination) qui implique un partage d'électrons provenant d'un des deux atomes voisins. Ce lien est particulièrement fort entre le soufre et l'or. Les Ac contiennent naturellement du soufre dans leur structure, soit sous

Tableau 2.1 Résumé des stratégies de fonctionnalisation de nanoparticules d'or avec des anticorps, en gras sont mises en évidence les liaisons non-covalentes.

Nom des procédés	Caractéristiques
Sans agent de réticulation	
Interactions faibles , [21] électrostatiques , [22] ou hydrophobes [22] Liaison dative [23]	Van der Waals ; non orienté non orienté idem Au - S ; Thiols libres sur Ac (cystéine)
Avec un agent de réticulation	
EDC, NHS ou EDC/Sulfo-NHS [21, 23–29] Hydrazide [23, 30–32] Protéine A, G ou A/G [27, 33] Traut's reagent [23]	Esters \rightarrow Amines primaires (Ac) ; non orienté Hydrazide \rightarrow Aldéhydes (sucres oxydés) ; spécifique au domaine Fc des Ac Protéines spécifiques au domaine Fc des Ac Introduction thiols dans Ac (via amines) ; non orienté
Avec plusieurs agents de réticulation	
Streptavidine/biotine [22, 33] <i>Click chemistry</i> [26]	Interaction protéine/vitamine orienté ou non Cycloaddition azide-alcyne ; spécifique au domaine Fc des Ac

forme de thiols libres dans certains acides aminés comme la cystéine soit dans les ponts dissulfures entre les chaînes du domaine Fc (voir la structure type d'une Ac à la figure 2.6). Pour introduire des thiols libres, Wang & al. ont utilisé du dithiothreitol (DTT) pour réduire ces liens dissulfure avant la conjugaison avec les NPs [23]. La figure 2.6 illustre ces différentes liaisons. Le désavantage commun de ces méthodes est le faible rendement d'anticorps par NP ($R_{Ab/NP}$) ; en effet, la surface occupée par un Ac sur une NP est d'autant plus grande que l'Ac est proche de la surface et que les points de liaisons sont multiples. Pour remédier à ce problème, des agents de réticulation sont parfois préférés et, dans la plupart des cas, contiennent un polymère entre les groupes fonctionnels qui agit comme espaceur (i.e. PEG).

La chimie de fonctionnalisation appelée *EDC/NHS* ou *EDC/Sulfo-NHS* est sans doute la plus utilisée en pratique mais n'est pas optimale en théorie. Un exemple de protocole est illustré à la figure 2.7. Plus généralement, une molécule contenant un groupe carboxylique

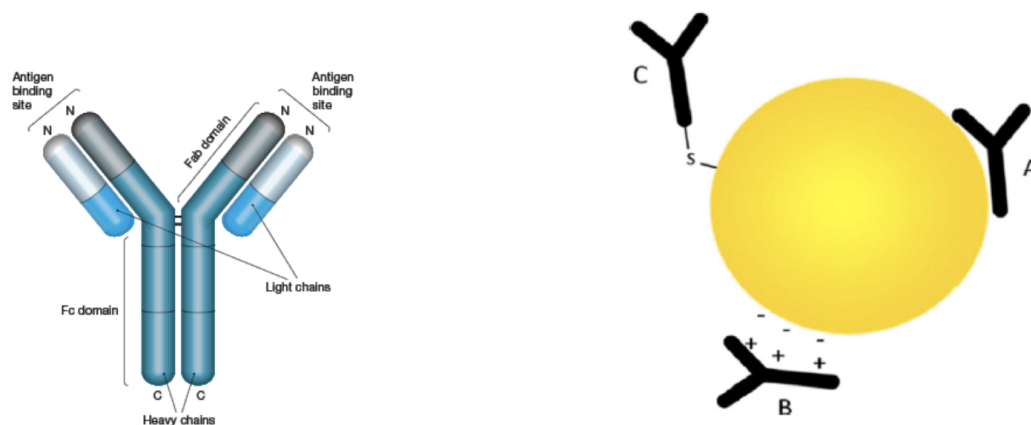


Figure 2.6 À gauche : schéma de la structure anticorps (Source : BioRad). À droite : illustration des fonctionnalisations sans agent de réticulation, par interactions faibles ou hydrophobes (A), par interactions électrostatiques (B) et par liaisons datives (C) [22].

à son extrémité est activée par l'ajout de 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) qui formera un groupe intermédiaire (ester) prêt à réagir avec des amines primaires (NH_3^+) pour former une liaison amide stable. La réaction pourrait s'arrêter avec l'ajout d'EDC, comme cela a été fait dans [23, 24], seulement le composé intermédiaire formé à ce stade est relativement peu réactif aux amines, assez instable en milieu aqueux et s'hydrolyse rapidement. C'est pourquoi du N-Hydroxysuccinimide (NHS), ou sa version plus soluble et stable le N-Hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS), est ajouté dans une seconde étape. Le groupe ester intermédiaire ainsi formé par le remplacement de l'EDC par le (Sulfo)NHS est très réactif envers les amines et cette procédure en 2 étapes donne un meilleur rendement que l'ajout de EDC seul [34].

Il existe beaucoup de variations entre les différents protocoles présentés dans la littérature. Malgré que le schéma général de la chimie tel que décrit précédemment soit respecté, certains paramètres comme le pH, la température, les temps d'incubation et les lavages ont des impacts plus ou moins importants sur le rendement de la réaction et doivent être optimisés. Par exemple, un pH légèrement acide (4-6) donne des meilleurs résultats pour l'activation des groupes carboxyliques avec EDC et réduit le processus d'hydrolyse des composés intermédiaires. Certaines conditions "optimales" sont plus difficiles à réaliser en pratique ; en effet, garder ses échantillons à basse température tout en effectuant un brassage de la solution pour une meilleure homogénéité durant les temps d'incubation demande des équipements plus coûteux. À ce jour, peu d'études poussées ont été réalisées pour l'optimisation d'un proces-

sus de fonctionnalisation en tenant compte de tous les paramètres (parfois inter-dépendants).

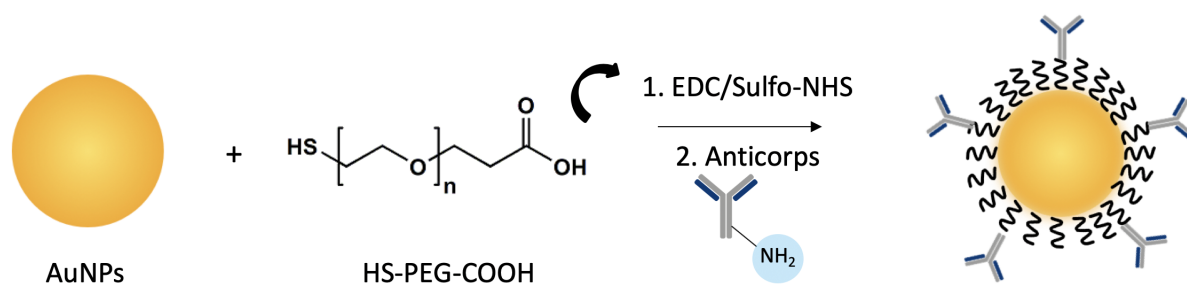


Figure 2.7 Schéma du protocole de fonctionnalisation EDC/Sulfo-NHS

Par contre, certains agents de réticulation contiennent un groupe ester NHS à leur extrémité qui permet une liaison directe avec les amines primaires des Ac, tel qu'illustré à la figure 2.8. Cette technique a l'avantage d'être directe puisqu'aucune activation n'est nécessaire. Par contre, le groupement NHS non-sulfonisé est très instable dans l'eau et son temps de demi-vie varie de quelques minutes à quelques heures dans les meilleures conditions (faible pH, basse température), ce qui entre en compétition avec la réaction avec les Ac. Dans l'exemple donné figure 2.8, les Ac conjugués à un PEG thiolé (Ac-PEG-SH) sont d'abord ajoutés aux NPs avant de combler les sites d'adsorption encore libres avec du méthyl PEG-SH (mPEG-SH). Il a été démontré que l'ajout séquentiel de Ac-PEG-SH et mPEG-SH donne de meilleurs résultats en terme de stabilité en milieu salin [25].

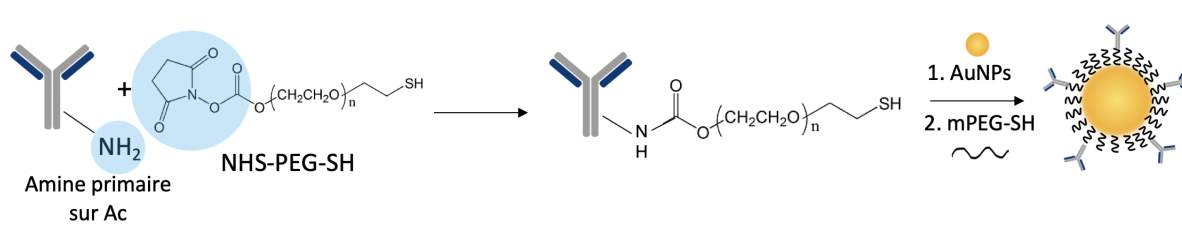


Figure 2.8 Schéma du protocole de fonctionnalisation NHS

Un enjeu important lors de la fonctionnalisation est le contrôle de l'orientation des Ac. Afin de garantir une activité² optimale de l'anticorps, il faut s'assurer que les régions Fab (cfr. schéma à la figure 2.6) soient libres et accessibles. En 2008, Kumar & al. proposent un protocole de conjugaison d'anticorps orientés sur des NPs d'or [30], celui-ci est représenté à la figure 2.9.

2. Sa capacité à se lier aux antigènes.

La procédure implique à nouveau un dérivé de PEG thiolé mais cette fois avec un groupe hydrazide à son extrémité³. Ce groupement formera un lien hydrazone avec les aldéhydes des anticorps. Les aldéhydes ne sont pas naturellement présents dans les Ac mais ils sont introduits par l'oxydation des sucres. Ces sucres se trouvant essentiellement sur la région Fc (donc non active) des Ac, les parties actives sont laissées intactes. Ce protocole fonctionne à condition que l'anticorps soit glycosylé (donc contienne des sucres) mais heureusement la plupart des immunoglobulines G (IgG) le sont.

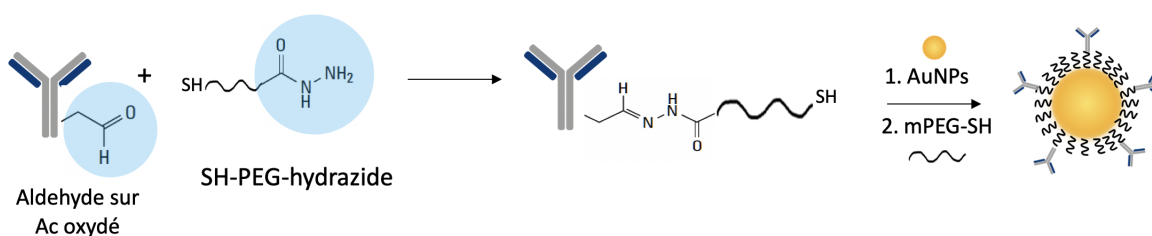


Figure 2.9 Schéma du protocole de fonctionnalisation Hydrazide

D'autres techniques ont également été évaluées par la communauté mais sont moins courantes. Certaines utilisent des agents de réticulation de grandes tailles (ex. Streptavidine/biotine) et il y a un risque que la fonctionnalisation affecte trop la taille et donc le spectre des nanoparticules. La technique de *Click Chemistry* utilise des groupements azides et alcynes pour faire le pont entre les anticorps et les NPs (des NPs de silices dans [26]) et est efficace mais est très longue et coûteuse en réactifs. Pour proposer une solution viable au plan économique, il fallait une méthode de fonctionnalisation peu coûteuse, rapide, efficace et robuste.

2.3.2 Compromis entre quantité et qualité

Afin de déterminer l'efficacité d'un protocole de fonctionnalisation, plusieurs facteurs sont étudiés :

- Spectres des NPs
- Taille des NPs
- Charge en surface des NPs
- Stabilité des NPs
- Nombre d'anticorps par NPs
- Activité des anticorps

3. Il est à noter que la molécule représentée dans le schéma n'est pas exactement la même que celle utilisée dans l'article, qui contenait un cycle aromatique la rendant plus stable, car celle-là n'est plus commercialisée.

En ce qui concerne les 4 premiers facteurs, des méthodes simples et bien établies sont disponibles (principalement spectroscopie et *Dynamic Light Scattering* (DLS)) mais ces facteurs sont peu efficaces pour comparer les protocoles de fonctionnalisation entre eux et donner des informations précises et univoques sur la présence des anticorps en surface des nanoparticules. Deux aspects cruciaux pour les applications biomédicales sont le nombre d'anticorps par NP et leur accessibilité. Plusieurs groupes ont tenté de quantifier le nombre d'anticorps sur les NPs par des méthodes simples mais souvent indirectes. À l'aide d'anticorps conjugués à des fluorophores [30] ou des enzymes [35], le principe consiste à faire une courbe de calibration avec des concentrations connues en anticorps, calculer la concentration en anticorps dans le surnageant après la centrifugation des NPs fonctionnalisées et de soustraire cette valeur à la concentration initiale afin d'en déduire le nombre d'anticorps restant dans la solution. Cette méthode se base sur l'hypothèse que **tous** les anticorps qui ne sont pas dans le surnageant sont liés aux nanoparticules. Or, cela n'est pas forcément le cas. Des anticorps peuvent être libres en solution ou s'être adsorbés aux parois du tube contenant les NPs. Impossible d'en être certain puisque la mesure ne se fait pas directement sur les NPs et la quantité d'anticorps est souvent surestimée.

En fonction du protocole, les résultats de la détection des anticorps par un essai enzymatique comme présenté dans [35] peuvent s'avérer trompeurs puisque l'enzyme étant également une protéine, la fonctionnalisation peut l'affecter et en altérer les propriétés. C'est pourquoi d'autres groupes ont rajouté une étape pour pallier ce problème : au lieu de quantifier les Ac directement fonctionnalisés sur les NPs, ils ont utilisé des Ac secondaires conjugués avec une enzyme pour la détection (cfr. figure 2.10). Cependant, cette méthode comporte un autre problème qui augmente l'imprécision du résultat ; en effet, plusieurs Ac secondaires peuvent se lier à un anticorps primaire sur les NPs et si la courbe de calibration ne tient pas compte de ce facteur, la quantité d'Ac secondaires calculée n'est pas égale à la quantité d'Ac primaires et cette dernière est surestimée. En résumé, malgré leur simplicité et faible coût, ces méthodes sont rarement précises pour la quantification du nombre d'anticorps lié aux NPs.

Saha & al. [36] proposent alors une méthode pour caractériser le nombre d'anticorps par NPs (ici des NPs magnétiques) et l'accessibilité des régions Fab et Fc à l'aide de la capture d'antigènes et de protéines G respectivement. Pour la quantification, ils ont conjugué les anticorps et la protéine G avec un élément radioactif (^{125}I) et ont mesuré le taux de radioactivité. Pour trouver les conditions optimales, ils ont répété l'expérience en faisant varier plusieurs paramètres importants de la fonctionnalisation par EDC. Certains paramètres ont été trouvés comme ayant peu d'influence sur le résultat final, comme le pH utilisé lors de l'activation des groupes COOH par EDC. Une des conclusions de leur travail est particuliè-

rement intéressante et rejoint celle de Tripathi & al. dans leur article [35] : un nombre élevé d'anticorps orientés aléatoirement sur les NPs équivaut à un faible nombre d'anticorps dont les régions Fab sont majoritairement accessibles.

2.4 Application biomédicale : la biodétection

Les nanoparticules métalliques ont de nombreuses applications en biomédical, notamment dans la biodétection. Dans ce domaine, on peut classer les applications en deux grandes classes : la détection de molécules en solution ou le ciblage de cellules cancéreuses.

Elahi & al. [37] comparent de nombreux systèmes de détection d'agents en solutions (ions, toxines, protéines, acides nucléiques, etc.) qui pour la plupart utilisent des nanobâtons ou *nanorods* (NR) en anglais. Par exemple, certains se basent sur le changement de couleur de la solution de NR fonctionnalisés lorsque l'antigène est ajouté. Cela est dû à l'agglomération des NR qui voient donc leur pic plasmon déplacé vers le rouge et dans des cas de forte agglomération, on voit une perte de la couleur de la solution. Pour une détection plus sensible, certains surveillent le changement de pic plasmon longitudinal (LSPR) au spectrophotomètre. Ceci est un exemple de détection où aucune séparation n'est nécessaire ; d'autres systèmes principalement basés sur le changement de taille des NPs peuvent être utilisés [38].

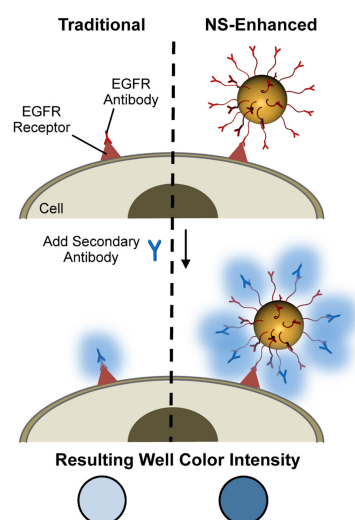


Figure 2.10 Schéma de l'ELISA avec signal augmenté grâce à des AuNPs. (Source : Billingsley & al. [39])

Les AuNPs fonctionnalisées ont aussi été utilisées pour augmenter le signal de détection de méthodes déjà existantes comme l'ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou la configuration de dosage à flux latéral. L'ELISA classique permet différentes configurations (une ou deux étapes, systèmes "sandwichs", etc.) mais de manière générale, il s'agit d'un type de dosage de protéines/antigènes qui utilise des anticorps conjugués à une enzyme appelée peroxydase de raifort (HRP, en anglais) et qui, par une réaction d'oxydation et par la libération de molécules luminescentes, donne une coloration bleue au contact d'un substrat (bien souvent du tetramethylbenzidine ou TMB). Le schéma à la figure 2.10 illustre très bien comment les AuNPs augmentent la sensibilité du test. Dans ce système, les AuNPs ont été conjuguées à des anticorps anti-EGFR et une fois incubées avec des cellules EGFR⁺, des anticorps secondaires conjugués avec HRP ont servi à la détection et le signal mesuré en absorbance a été significativement amplifié [39].

Cette technique conduit à une autre application des NPs fonctionnalisées qui est le ciblage de cellules cancéreuses. Que ce soit pour du diagnostic ou du traitement, des modèles *in vitro* ou *in vivo*, l'objectif est le même : guider les NPs pour qu'elles se lient spécifiquement aux cellules cancéreuses. Comme expliqué à la section 2.2, les cellules cancéreuses surexpriment certains antigènes et leur identification permet de les conjuguer les NPs avec les anticorps correspondants et de faire le ciblage. Dans notre laboratoire, ce ciblage de cellules cancéreuses a déjà été démontré à des fins de traitements [25]. Des systèmes d'imagerie permettant la visualisation des nanoparticules sur les cellules ont aussi été développés et seront présentés dans la section 2.4.2.

2.4.1 Interaction nanoparticules/cellules

De nombreux paramètres sont à considérer lorsqu'on utilise l'interaction des NPs avec les cellules pour faire du diagnostic. Les NPs ont plusieurs voies d'interaction avec les cellules et ce n'est pas forcément le résultat de l'attachement spécifique entre un anticorps et son antigène. De nombreux groupes ont étudié ces interactions et plus précisément l'effet de la taille sur l'absorption des NPs [40], où 50 nm a été trouvée comme étant la taille ayant la plus grande absorption dans la lignée étudiée, mais aussi quels étaient les processus d'absorption des NPs ; dans [41] sont présentés les différents modes d'internalisation possible (ex. endocytose), les facteurs importants (ex. taille, forme et charge des NPs) mais aussi les techniques utilisées pour sonder et quantifier l'internalisation ou l'attachement des NPs sur les cellules (ex. cytométrie en flux, microscopie, etc.) .

En particulier, ils soulèvent le problème des paramètres ignorés et des biais dans les études effectuées. Par exemple, dans les études de cytotoxicité il n'y a bien souvent pas de distinction entre l'effet des NPs elles-mêmes ou des agents stabilisants présents dans leur milieu. Un autre biais important qui est souvent négligé dans les études *in vitro* est l'effet de la sédimentation des NPs. Cho & al. [42] ont d'ailleurs réussi à démontrer que celle-ci avait un effet non négligeable, surtout pour les larges NPs. À la section 6, les vitesses de sédimentation des nanoparticules d'or utilisées dans ce projet sont calculées dans le contexte d'une incubation avec des cellules *in vitro* en deux dimensions. De plus, un autre groupe a observé que la concentration de NPs incubées avec les cellules avec beaucoup plus d'effet que le temps d'incubation mais que la température avait aussi un effet significatif [28]. Ces paramètres devront donc être pris en compte lors de la mise au point du protocole d'immunomarquage.

2.4.2 Imagerie

Afin de rendre la solution proposée la plus réalisable possible, il fallait penser à ce que les pathologistes utilisent couramment en laboratoire et ce qui pourrait apporter de la nouveauté tout en les accommodant au maximum afin de garantir une utilisation régulière du nouveau système. Les images d'IHC sont prises par microscopie en champ clair, il fallait donc un système compatible avec ce montage pour pouvoir faire une transition. Le tableau 2.2 compare trois techniques d'imagerie qui sont accessibles dans le laboratoire et ont démontré des résultats prometteurs pour une application d'immunomarquage de cellules avec des nanoparticules ; ces techniques sont schématisées à la figure 2.11.

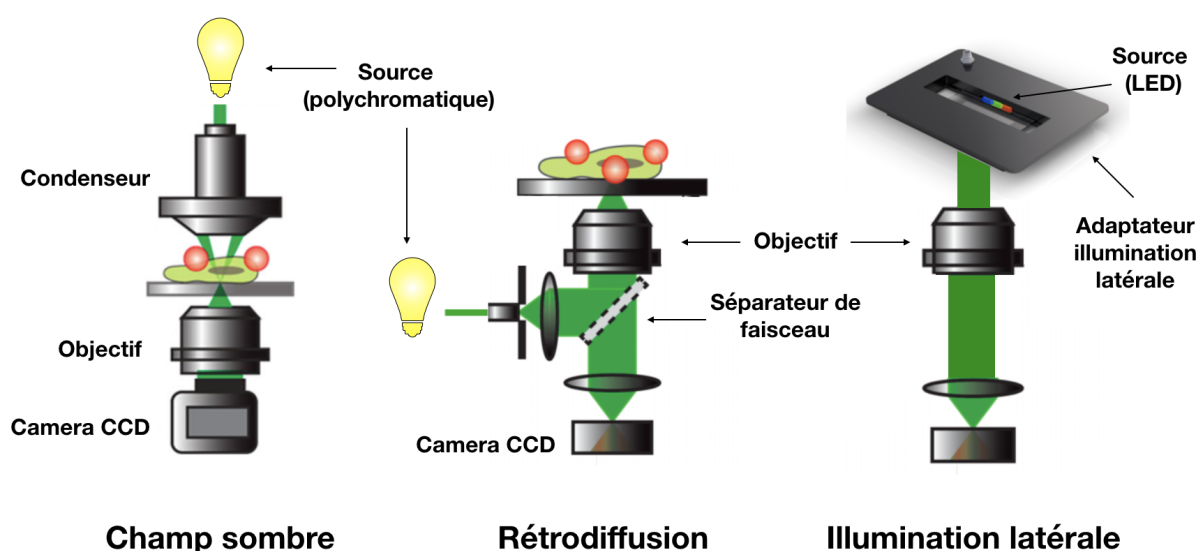


Figure 2.11 Description schématique des trois techniques d'imagerie comparées (dessins adaptés de [43, 44])

La microscopie en champ sombre a beaucoup été exploitée par les précédents étudiants pour imager des cellules ciblées avec des nanoparticules d'or [25, 44]. En quelques mots, cette technique requiert l'utilisation d'un condenseur qui se place à la sortie de la source lumineuse utilisée en champ clair, ce qui la rend incompatible avec une utilisation combinée de la microscopie en champ clair. De plus, le condenseur est une pièce très coûteuse qui se rajoute au coût de la mise en place du système. Malgré un bon rapport signal sur bruit, le contraste des nanoparticules avec les cellules n'est pas très bon et la résolution latérale qui permet de distinguer les NPs isolées est moins performante que les deux autres techniques. En effet, la résolution est limitée par l'ouverture numérique de l'objectif qui doit être plus petite que

Tableau 2.2 Résumé comparatif de trois méthodes d'imagerie permettant l'imagerie des échantillons de cellules porteuses de nanoparticules.

Propriété	Champ sombre	Rétrodiffusion	Illumination latérale
Visibilité des cellules	Bonne	Mauvaise	Très bonne
Contraste NPs VS cellules	Moyen	Faible	Très bon
Facilité d'implémentation	Contraignante	Moyenne	Facile
Ouverture numérique nécessaire	Petite	Grande	Au choix
Résolution axiale	Moyenne	Très bonne	Bonne
Résolution latérale	Moyenne	Très bonne	Bonne
Compatibilité avec microscopie en champ clair	Non	Oui	Oui
Illumination homogène	Oui	Oui	Non
Coût	Élevé	Moyen	Faible

celle du condenseur [43]. Finalement, l'imagerie par illumination latérale est peu dispendieuse car dans l'optique d'une production à grande échelle, la compagnie VegaPhoton pourrait fabriquer l'adaptateur d'illumination latérale pour quelques centaines de dollars seulement. De plus, cet adaptateur peut être ajouté à n'importe quel microscope (également compatible avec un condenseur pour de l'imagerie en champ sombre) et est facile à déplacer [45]. Une technique similaire avait déjà été évoquée dans [46], où des filtres spectraux servaient à illuminer l'échantillon selon certaines longueurs d'ondes et permettaient de réaliser du multiplexage. Dans l'illumination latérale, ces filtres sont remplacés par trois lampes LED (Light Emitting Diode) de couleurs différentes (Rouge, Vert et Bleu) et dont l'intensité est modulable indépendamment. Ce système évite l'utilisation d'un objectif à huile contrairement à la rétrodiffusion ; de plus, le contraste des nanoparticules avec les cellules est très bon, ce qui facilite le comptage visuel.

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIES EXPÉRIMENTALES DE FONCTIONNALISATION DE NANOPARTICULES PLASMONIQUES

Ce chapitre décrit les différentes procédures utilisées pour la PEGylation de nanoparticules, la fonctionnalisation selon les différents protocoles et les techniques de caractérisation. Des nanoparticules d'or de 100 nm ont été utilisées pour réaliser la preuve de concept. Le choix de la taille dépend de notre capacité à les détecter par imagerie et du spectre qu'on souhaite observer.

3.1 PEGylation

Les protocoles suivants concernent principalement l'étude de l'ajout de PEG sur les nanoparticules d'or. Le PEG est un polymère qui existe en différentes tailles ou poids moléculaires. Ces derniers sont généralement donnés en kDa (10^3 g/mol) et le choix du PEG s'est basé sur celui qui procure la plus grande stabilité aux NPs sans entraver l'efficacité de la conjugaison avec les anticorps. Un post-doctorant précédent a trouvé que le SH-PEG_{5kDa} augmentait sensiblement la stabilité des NPs en milieu salin par rapport au SH-PEG_{2kDa} [25], c'est pourquoi ce poids moléculaire a été utilisé tout au long du projet. Par ailleurs, en fonction des protocoles, deux sortes de PEG thiolés ont été utilisés : du mPEG-SH et du SH-PEG-COOH. Ceux-ci ont été achetés sous forme de poudre chez Nanocs (New York, NY, USA). Le SH-PEG-COOH a été stocké ainsi sous atmosphère inerte (Azote) à -20°C tandis que le mPEG-SH était sous forme d'aliquots dilués dans du DMSO (Dimethyl Sulfoxide) à -80°C .

3.1.1 Courbes de calibration

Afin de pouvoir retrouver la concentration dans les échantillons de nanoparticules fonctionnalisées, il était nécessaire de faire des courbes de calibration du maximum d'absorbance en fonction de la concentration en nanoparticules. Pour cela, deux courbes de calibrations ont été faites à partir de AuNPs 100 nm achetées commercialement chez Nanopartz Inc. (Loveland, CO, USA). L'une avec les AuNPs comportant du citrate comme agent stabilisant et l'autre avec les AuNPs PEGylées. La procédure consistait à réaliser une dilution en série en partant d'une solution mère à la même concentration que celle du fabricant, c'est à dire $50\text{ }\mu\text{g/mL}$, qui correspondait au premier standard. En fonction des lots, cela correspondait à $4,96 \times 10^9$ ou $5,96 \times 10^9$ NPs/mL. Concrètement, 1 mL du premier standard était pipeté dans un tube à

faible rétention de 1,5 mL, 500 μ L d'eau distillée étaient pipetés dans 6 autres tubes puis 500 μ L du premier standard étaient transférés au deuxième, et ainsi de suite. Chaque standard était vortexé¹ après la dilution afin d'assurer une solution homogène et un blanc était réalisé sans les AuNPs. Ensuite, les spectres d'absorbance ont été mesurés selon la même procédure décrite à la section 3.3 et les maxima d'absorbance ont été reportés dans un fichier excel.

L'expérience a été répétée dans deux milieux différents (eau distillée et milieu de culture contenant du sérum foetal bovin) avec deux lots de AuNPs. Afin de s'assurer que la concentration en AuNPs soit la même pour les deux courbes, aucune étape de centrifugation n'a été effectuée. Il faut noter aussi que les AuNPs n'ont pas été PEGylées avec la même concentration de PEG dans les deux expériences. En effet, pour celle dans l'eau la concentration en SH-PEG-COOH était de 2 mg/mL tandis que dans le milieu de culture, les AuNPs ont été PEGylées avec 0,025 mg/mL de mPEG-SH.

3.1.2 Variation du temps d'incubation

Dans cette expérience, 6 tubes de 1 mL de AuNPs de 100 nm de diamètre ont été incubées avec du mPEG-SH à une concentration finale de 0,025 mg/mL et un tube de AuNPs sans PEG a servi de contrôle négatif (représenté comme le temps 0 sur les figures). Chaque tube a été incubé avec le PEG pendant des temps d'incubation différents, variant de 1 h à 30 h et la fin de l'incubation était marquée par une étape de centrifugation pendant 5 min à $5\,000 \times g$. Le surnageant était alors remplacé par de l'eau distillée propre et les AuNPs-PEG étaient resuspendues avec des passages au vortex et au sonicateur. Ensuite, les spectres d'absorbance, la taille hydrodynamique et le potentiel zêta ont été mesurés.

3.2 Protocoles de fonctionnalisation avec des anticorps

Les protocoles suivants ont été adaptés pour des nanoparticules d'or de 100 nm. Les schémas des stratégies respectives sont illustrés aux figures 2.7, 2.8 et 2.9. Celles-ci ont été sélectionnées pour leur simplicité et leur efficacité rapportée dans la littérature mais aussi grâce à l'expertise des membres du laboratoire. Les techniques utilisant des esters NHS ont notamment été employées par un ancien post-doctorant [25, 46].

1. Les solutions sont mélangées par une plaque vibrante qui va créer un vortex au contact du tube de l'échantillon.

EDC/NHS (cfr. figure 2.7)

La première étape consiste à recouvrir les AuNPs de SH-PEG-COOH. D'abord, 2 mg sont pesés et dilués dans 50 μ L de DMSO. À ces 50 μ L est ajouté 1 mL de AuNPs 100 nm à 50 μ g/mL et le tout est incubé durant la nuit dans un tube conique à faible affinité de 1,5 mL. Cette incubation, ainsi que les suivantes, sont faites à température ambiante et les tubes sont placés sur un plateau tournant à 24 tours par minute pour le mélange. Les AuNPs PEGylées sont alors centrifugées à 5 000 \times g pendant 5 min et le surnageant est jeté. Ensuite, 3 mg de EDC et 3 mg de Sulfo-NHS sont pesés, dilués dans 1 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7,4 et cette solution, ou 1 mL de PBS pour le contrôle négatif, est ajoutée au culot de AuNPs-PEG-COOH. Les nanoparticules sont vortexées et soniquées² puis incubées pendant une heure. Les anticorps (5 μ g) sont alors ajoutés à la solution et l'incubation est poursuivie pendant 2 h. Finalement, les nanoparticules sont centrifugées à 7 000 \times g pendant 10 min, le surnageant est soit récolté pour d'autres analyses soit rejeté et les AuNPs sont ensuite resuspendues dans 1 mL de tampon à pH 7 PB (Phosphate Buffer) ou PBS. Pour la caractérisation, 500 μ L de la solution sont prélevés et dilués dans 500 μ L d'eau distillée. Il est important de noter que la fonctionnalisation via EDC/Sulfo-NHS n'est pas spécifique aux anticorps mais peut se lier à tout ce qui contient des amines, or beaucoup d'anticorps commerciaux (dont l'anti-CD44 monoclonal utilisé dans ce protocole) contiennent de la BSA (Bovine Serum Albumin) qui est une protéine aidant à la stabilité des anticorps faiblement concentrés. En théorie, la présence de la BSA pourrait diminuer le rendement de la fonctionnalisation.

NHS (cfr. figure 2.8)

Des solutions mères de SH-PEG-NHS et mPEG-SH ont été préparées à 10 mg/mL dans le DMSO et stockées sous forme d'aliquots à -80°C jusqu'à utilisation. Les anticorps à 1 mg/mL (10 μ g) ont été dilués dans une solution de PB 10 mM à pH7 et puis mélangés à une solution de SH-PEG-NHS à 0,1 mg/mL (dilution 1 :10 dans de l'eau distillée à partir de la solution mère) selon le ratio molaire 1 :2. Le mélange est alors vortexé et laissé pour incubation sur un rotateur pendant 2 h à température ambiante. La réaction est alors arrêtée avec l'ajout de 10 μ L de tampon à pH 8,5 (Borate 100 mM) et des aliquots sont préparés et une partie est conservée à -20°C. La concentration en anticorps dans cette solution est donc de 100 μ g/mL et 12,5 μ L sont nécessaires pour fonctionnaliser 1 mL de AuNPs. Cette quantité peut varier mais est calculée pour avoir environ 1 000 Ac/NP. En effet, sachant que les anticorps ont

2. La sonication est réalisée en plongeant les tubes dans un bain d'eau dans lequel sont envoyés des ultrasons.

généralement un poids moléculaire d'environ 150 kDa et que le nombre de NPs dans 1 mL de solution est de $4,96 \times 10^9$ ou $5,96 \times 10^9$ selon le lot et les spécifications du fabricant, on trouve que

$$\frac{0,0125 \text{ mL} * 100 \text{ } \mu\text{g/mL} * N_A}{150 \times 10^9 \text{ } \mu\text{g/mol} * \text{Nombre NPs}} \approx 850 - 1000 \text{ Ac/NP}$$

avec $N_A = 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ le nombre d'Avogadro. Après une incubation de 2 h à température ambiante sur un rotateur, 2,5 μL de la solution mère de mPEG-SH sont ajoutés et l'incubation est prolongée de 2 h. Les AuNPs sont alors centrifugées 2 fois pendant 5 min à $5\,000 \times g$ et resuspendues dans 1 mL de solution tampon à pH 7 (PB ou PBS).

Hydrazide (cfr. figure 2.9)

Le protocole de fonctionnalisation à l'aide de SH-PEG-Hydrazide provenant de chez Nanocs à été adapté de celui publié dans Nature en 2008 par Kumar & al. [30]. Une solution à 46,5 mM de SH-PEG-hydrazide a été préparée dans de l'eau distillée. Tout comme le protocole NHS, la première partie consiste à conjuguer les anticorps avec l'agent de réticulation et ensuite de fonctionnaliser les NPs.

Pour l'oxydation des anticorps, 5 μL de 100 mM NaIO_4 ont été ajoutés à 50 μL d'anticorps à 1 mg/mL et incubés pendant 30 min dans le noir. Après l'ajout de 250 μL de PBS pour arrêter la réaction, 1 μL de la solution mère de SH-PEG-hydrazide a été mélangé aux anticorps. L'incubation s'est alors poursuivie pendant 1 h à température ambiante et le tout a finalement été filtré à 10 kDa MWCO (Molecular Weight Cut-Off) dans un tube de microcentrifugation (Amicon) contenant 500 μL de solution tampon 40 mM HEPES pH 8,5. La filtration par centrifugation ($2\,000 \times g$ pendant 20 minutes) permet de se débarrasser des agents de réticulation qui n'ont pas réagi avec les anticorps mais pas les anticorps libres en solution. Le culot restant dans le filtre a été récupéré et resuspendu dans 500 μL de solution tampon 40 mM HEPES pH 8,5.

Pour la deuxième partie, 20 μL de la solution de SH-PEG-Ac à 100 $\mu\text{g/mL}$ sont incubés avec 1 mL de AuNPs 100 nm à 50 $\mu\text{g/mL}$ pendant 2 h à température ambiante sur un rotateur. Ensuite, 20 μL de mPEG-SH dilués à 10 mM sont ajoutés et l'incubation se poursuit pendant 2 h. Les AuNPs-PEG-Ac sont finalement centrifugées à $2\,500 \times g$ pendant 15 min à température ambiante, le surnageant est soit jeté soit gardé pour d'autres analyses et le culot de nanoparticules est resuspendu dans 1 mL de solution tampon à pH 7 (PB ou PBS).

3.3 Caractérisation

3.3.1 Spectres d'absorbance

Pour la mesure des spectres, 200 μL des échantillons ont été transférés dans une plaque à 96 puits en polystyrène et l'absorbance en transmission a été mesurée avec un lecteur de plaque Epoch de BioTek de 300 à 800 nm avec un pas de 1 nm. Un blanc a été mesuré avec le milieu dénué de nanoparticules (en général du PBS ou de l'eau distillée) et ce spectre a été déduit des échantillons.

3.3.2 Dynamic Light Scattering (DLS)

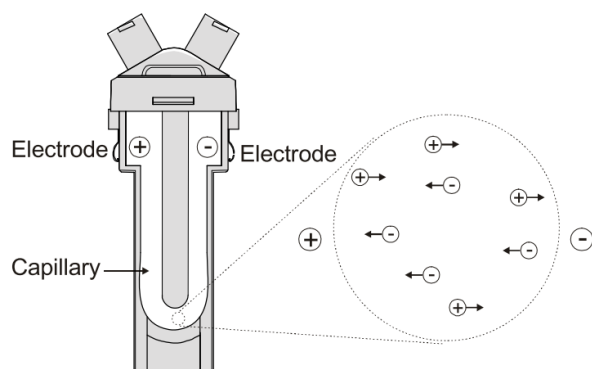


Figure 3.1 Image d'une cellule de mesure DLS et des charges en présence pour la mesure du potentiel zêta (Source : Malvern [47]).

Cette méthode utilise les données connues de la solution (indices de refraction, viscosité, température, etc.) et la lumière diffusée à un certain angle après l'irradiation par un laser pour calculer le diamètre hydrodynamique des particules en solution ainsi que leur potentiel zêta. Le calcul du diamètre hydrodynamique est basé sur une estimation du coefficient de diffusion des particules qui est la vitesse des particules sous le mouvement Brownien. Par contre, la mesure du diamètre hydrodynamique est limitée aux particules sphériques et ne convient pas aux nanobâtons par exemple.

Le laser du ZetaSizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern), utilisé ici pour les mesures, irradie à 633 nm avec une puissance de 4 mW et détecte à un angle de 173° pour la mesure de la taille et à 13° pour le potentiel zêta. Ce dernier est la charge au plan de glissement autour de la nanoparticule, qui est mobile avec la nanoparticule. Le potentiel zêta est sensible au pH et est une bonne indication de la stabilité d'une solution ainsi que sur le revêtement en surface des nanoparticules [47]. Il est mesuré en faisant passer un champ électrique dans la solution, entre les deux électrodes de la cellule. Il est important de garder les mêmes conditions de température, pH et salinité entre chaque échantillon afin que les mesures soient comparables et reproductibles [48].

En pratique, 800 μL à 1 mL des échantillons (dont la solution tampon à pH 7 ne contenait pas de sel) ont été supplémentés de NaCl à une concentration finale de 5 mM afin de garantir une conductivité suffisante pour la mesure de potentiel zêta mais sans induire d'instabilité ou d'agglomération des nanoparticules. Les mesures ont été prises 3 fois pour chaque échantillon à 25°C.

3.3.3 Surface Plasmon Resonance (SPR)

Brièvement, la mesure de la SPR permet de mesurer le changement d'indice de réfraction et l'angle de la lumière réfléchi sur une surface d'or après une modification de sa surface. En effet, l'indice de réfraction de minces couches d'or est très sensible à l'addition de molécules en surface et il est possible de quantifier le nombre de molécules ajoutées car la réponse est proportionnelle au poids moléculaire. Ceci est valable tant que l'on reste à une distance suffisamment proche de la surface et les variations deviennent indétectables lorsqu'on dépasse la distance limite (environ 300 nm) [4]. Le signal SPR est mesuré en unité relative (RU) et il est possible de quantifier la masse de protéines sur la surface avec la relation suivante : $1 \text{ RU} \approx 1 \text{ pg/mm}^2$ [49]. La quantification n'a pas été faite pour le SH-PEG dans la première étude car le résultat qualitatif en terme de RU était suffisant pour tirer une conclusion. Par ailleurs, la relation exacte varie avec l'indice de réfraction de la molécule et n'est pas forcément valable pour le PEG.

Deux études ont été réalisées en mesurant le changement de SPR : la première pour vérifier la dépendance en pH de l'attachement de SH-PEG_{5kDa} sur une surface d'or et la deuxième pour déterminer le pH optimal pour l'attachement d'anticorps sur une surface d'or recouverte de Dextran par la stratégie d'EDC/NHS. Les solutions tampons qui ont servi à diluer le PEG ou les anticorps ont été préparées sans sel avec un mélange de solution de phosphate de sodium monobasique et dibasique 10 mM (pH 6,5 et 7,5) ou de borate 10 mM (pH 8,5 et 9,5). Du OH-PEG_{5kDa} a servi de contrôle négatif car il ne contient pas de groupement thiol pouvant réaliser une liaison covalente avec l'or.

Dans la première étude, les solutions de SH-PEG_{5kDa} ou OH-PEG_{5kDa} ont été diluées dans les solutions tampons correspondantes à partir de solutions mères à 10 mg/mL. La concentration finale injectée était de 0,025 mg/mL et la vitesse d'injection sur les canaux était de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les injections ont chacune duré 30 min et les mesures ont été prises sur une machine Biacore T100. À la fin des injections, une solution tampon de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) était injectée avec le même débit pour nettoyer les canaux des molécules non liées.

La seconde étude de la SPR a été effectuée sur des substrats d'or couverts d'une couche de 100-200 nm de dextran (puces CM5). Le dextran qui couvre la couche d'or dans cette expérience comporte un groupement COOH qui peut être activé par EDC/NHS et servir de modèle pour la liaison entre le NHS et les anticorps. La méthode utilisée est présentée à la figure 3.2. Les injections d'anti-HER2 (Trastuzumab) ont été faites en 3 fois : une injection d'une minute suivie d'une pause d'une minute et puis 2 injections de 3 minutes. Cela dans le but de vérifier qu'avec le débit et la concentration choisie, on ne sature pas la surface en anticorps trop rapidement.

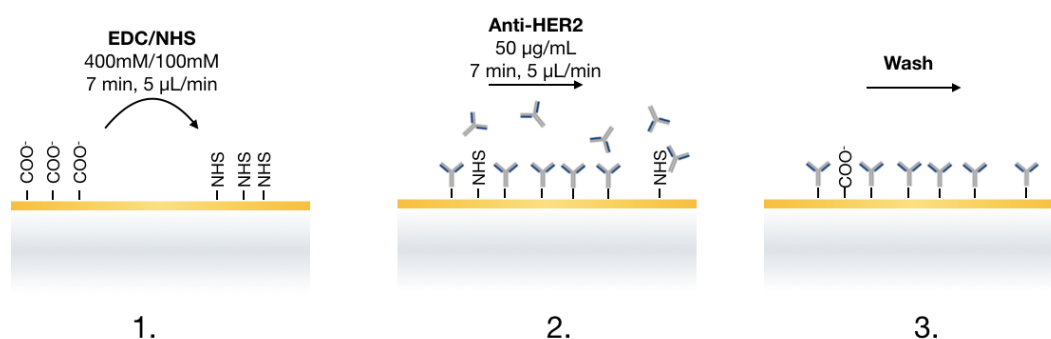


Figure 3.2 Schéma représentatif de l'étude SPR. Activation du dextran avec EDC/NHS (1.), injections d'anti-HER2 (2.) et lavage avec tampon de migration (3.).

3.3.4 Imagerie des nanoparticules fonctionnalisées

Lors d'expériences indépendantes, des AuNPs ont été fonctionnalisées selon les différents protocoles de fonctionnalisation avec des anticorps conjugués à un fluorophore. Pour les protocoles NHS et hydrazide, il s'agit d'anticorps secondaires chèvre anti-lapin achetés chez la compagnie Abcam (Toronto, ON, Canada) qui étaient conjugués avec soit de l'Alexa Fluor₄₈₈ (AF488) soit un type de cyanine (Cy3). Pour le protocole EDC-NHS, des anticorps lapin anti-humain CD44 conjugués avec un dérivé de la fluorescéine (FITC) ont été utilisés dans cette expérience. Quelques μL de la solution finale des AuNPs fonctionnalisées ont été déposés sur une lamelle de microscope avec du *Vectashield mounting medium* pour prolonger la stabilité du fluorophore et l'échantillon a été scellé par un mince couvercle de verre. Les images ont été prises sur un microscope inversé Eclipse Ti de Nikon équipé d'une lampe XCite, d'un miroir pour la visualisation en rétrodiffusion et de filtres adaptés aux spectres

d'excitation et d'émission de la FITC et de l'AF488 (488 nm/520 nm) ou de la Cy3 (552 nm/565 nm). Le contraste a été augmenté et les images ont été alignées spatialement, sur le logiciel de traitement d'images Fiji (de ImageJ) à l'aide du programme intégré *StackReg*, afin de pouvoir appliquer un programme intégré de colocalisation et mettre en évidence la superposition de la fluorescence avec les AuNPs. Pour les images des protocoles NHS et Hydrazide, l'illumination n'était pas homogène sur toute l'image et une région d'intérêt a été découpée avant de calculer l'efficacité de la colocalisation des AuNPs avec la fluorescence.

3.3.5 Quantification du nombre d'anticorps par nanoparticule

La procédure appliquée ici est semblable à celles déjà reportées dans la littérature [30, 35] mais a été améliorée pour éviter un maximum de biais. Tout d'abord, deux courbes de calibration ont été faites avec de l'anti-CD44(FITC) de 0 à 500 ng/mL, la première dans du PBS et la seconde dans du PBS en présence de AuNPs 100 nm à 25 μ g/mL. Les différences entre les deux courbes étaient négligeables et la courbe contenant les AuNPs a été conservée. L'intensité en fluorescence a été mesurée vers le haut sur un spectrophotomètre Tecan Infinite 200 avec un gain de 132, une excitation à 488 nm et une émission lue à 525 nm. Plusieurs échantillons ont alors été testés : un contrôle avec des AuNPs fonctionnalisées suivant le protocole d'EDC-NHS où l'étape d'activation avec EDC/sulfo-NHS était supprimée (du PBS était ajouté à la place), un tube avec des AuNPs fonctionnalisées avec EDC-NHS et un tube avec des AuNPs fonctionnalisées suivant le protocole NHS. Dans tous les cas, l'anticorps utilisé était de l'anti-CD44(FITC) avec une quantité initiale ajoutée de 5 μ g. Chaque tube a été centrifugé deux fois et les surnageants ont été conservés pour la mesure également. Pour chaque condition, 200 μ L ont été transférés dans des puits d'une plaque noire à 96 puits à fond plat, en duplicata. Les spectres des échantillons à la fin des deux lavages ont également été mesurés de 300 à 800 nm et le nombre de nanoparticules a été calculé à partir de la courbe de calibration à la figure 4.3 (dans l'eau, avec PEG).

CHAPITRE 4 RÉSULTATS DE LA FONCTIONNALISATION DE NANOPARTICULES PLASMONIQUES

Ce chapitre présentera d'abord les résultats obtenus sur l'interaction entre des PEG thiolés et l'or des nanoparticules avant de passer aux résultats de la caractérisation des nanoparticules fonctionnalisées selon le protocole EDC/NHS. Une comparaison sera enfin faite avec les résultats des procédures NHS et Hydrazide.

4.1 Étude de la PEGylation

Les protocoles de fonctionnalisation qui sont utilisés dans cette démarche utilisent tous des dérivés de PEG thiolés. Une partie importante de la fonctionnalisation repose donc sur l'attachement de PEG-SH sur les NPs, cela pour garantir une couverture optimale des sites d'adsorption non spécifiques mais aussi pour assurer un meilleur rendement de conjugaison avec des anticorps. Dans le but de mieux interpréter les résultats de la caractérisation sur les NPs fonctionnalisées et pouvoir faire la distinction entre les NPs PEGylées et les NPs avec PEG et anticorps, il faut d'abord bien comprendre les effets de la PEGylation sur la chimie de surface des nanoparticules d'or. Les deux principaux paramètres qui ont été observés sont le pH et le temps d'incubation du PEG avec les AuNPs. L'influence du pH a été évaluée à l'aide de mesures de la SPR suite à l'attachement de PEG-SH sur une surface d'or et les résultats sont montrés aux figures 4.1 et 4.2.

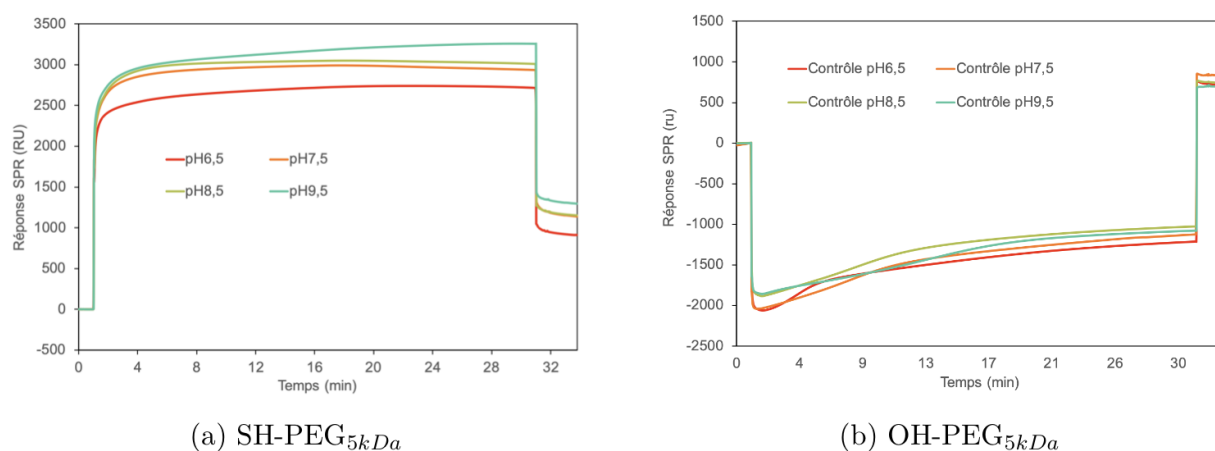


Figure 4.1 Courbes SPR de la PEGylation d'une puce d'or à différents pH. Injections de 30 minutes.

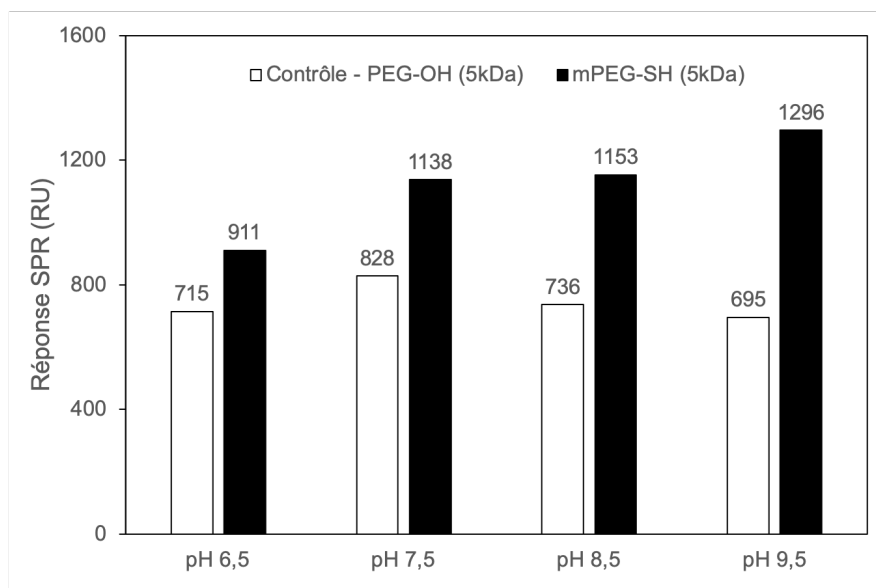


Figure 4.2 Réponse relative environ 3 minutes après la fin de l'injection de SH-PEG_{5kDa} ou OH-PEG_{5kDa} à différents pH pendant 30 min.

Sur les courbes présentées à la figure 4.1, 4 pH variant de 6,5 à 9,5 ont été testés. Une réponse non négligeable a été mesurée pour le contrôle négatif (OH-PEG_{5kDa}), avec un pic au pH 7,5. Il faut noter que si les allures des courbes sont différentes entre le OH-PEG_{5kDa} et le SH-PEG_{5kDa}, ceci est probablement dû à leurs indices de réfraction respectifs. On constate que l'attachement SH-PEG_{5kDa} augmente avec le pH et les différences les plus grandes se trouvent de 6,5 à 7,5 et de 8,5 à 9,5. Une amélioration proposée pour les protocoles de fonctionnalisation serait de réaliser la PEGylation à pH alcalin. Cela n'est malheureusement pas compatible avec les anticorps qui nécessitent un pH physiologique (7,4), donc l'adaptation ne serait possible que dans les protocoles qui commencent par une étape de PEGylation avant d'ajouter les anticorps.

Une seconde étude a été faite pour évaluer l'effet de la PEGylation sur l'intensité du signal en absorbance des NPs. Des courbes de calibrations ont été réalisées dans différentes conditions et sont montrées à la figure 4.3. Dans les deux milieux, dans l'eau ou dans le milieu de culture, il y a une différence entre les pentes des deux courbes et l'absorbance des NPs PEGylées est légèrement inférieure à celle des NPs avec citrate. Dans l'eau, la différence entre les pentes ($\frac{m_{citrate} - m_{PEG}}{m_{citrate}} * 100\%$) est égale à 13% et dans le milieu de culture elle est de 9%. Le fait que la PEGylation ait été effectuée selon différentes concentrations de PEG peut expliquer en partie la différence entre les écarts de pente dans les deux milieux. De plus, pour les courbes effectués dans le milieu de culture, l'ajout de protéines sur les AuNPs aura aussi un impact

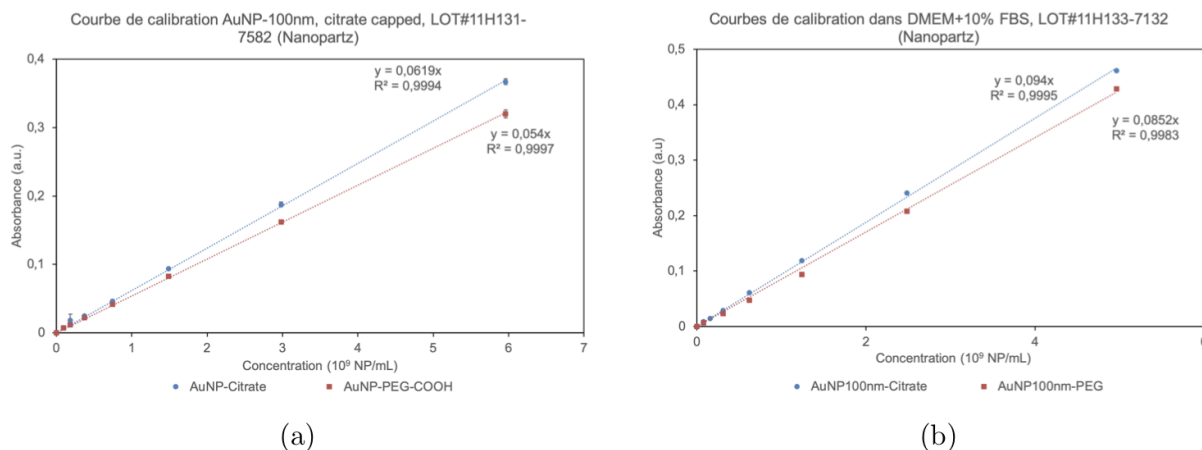


Figure 4.3 Courbes de calibration de nanoparticules d'or commerciales, avec ou sans PEG, dans l'eau (a) ou du milieu de culture supplémenté de FBS (b).

sur l'absorbance et il est probable que cet effet soit plus important pour les AuNPs-citrate puisqu'il y a moins d'encombrement stérique en l'absence de polymère en surface. Ceci aura donc pour effet de réduire l'écart de pente entre AuNPs-citrate et AuNPs-PEG. Il est difficile de déterminer si ces écarts sont significatifs à ce stade mais cela sera évalué au chapitre 5 dans le contexte des expériences *in vitro*.

Finalement, l'influence du temps d'incubation sur le pic plasmon, la taille et la charge des AuNPs a été testée. Les résultats des valeurs obtenues à la suite des différents temps d'incubation sont montrés à la figure 4.4. Le décalage en longueur d'onde du pic plasmon sature après 2h d'incubation et l'absorbance commence par diminuer avec l'ajout de PEG puis augmente après 2 h d'incubation. En regardant les mesures de taille et de charge, on constate que le potentiel zêta a tendance à augmenter avec la taille des nanoparticules. Sachant que l'augmentation de taille est ici due à l'ajout d'une couche de PEG, on peut donc déduire que cette couche de PEG agit comme écran de la charge négative des AuNPs et que la densité et/ou la taille de cette couche a un impact sur la valeur de la charge mesurée. On remarque que dans les mesures DLS, il y a un pic à 4 h d'incubation (cfr. figures 4.4c et 4.4d).

À défaut d'avoir d'autres informations sur les processus en cours à la surface des nanoparticules, les données obtenues permettent d'émettre des hypothèses explicatives. Un scénario probable est qu'une monocouche de PEG est atteinte après 2 h d'incubation (d'où la saturation à la figure 4.4a) et ensuite, les chaînes polymériques se réorganisent pour passer à une

conformation plus allongée, ce qui augmente la taille et la densité de la couche. Finalement, après 4 h d'incubation les chaînes de PEG les plus faiblement liées commencent à se désorber de la surface d'or, ce qui expliquerait la diminution de la taille mesurée et du potentiel zêta.

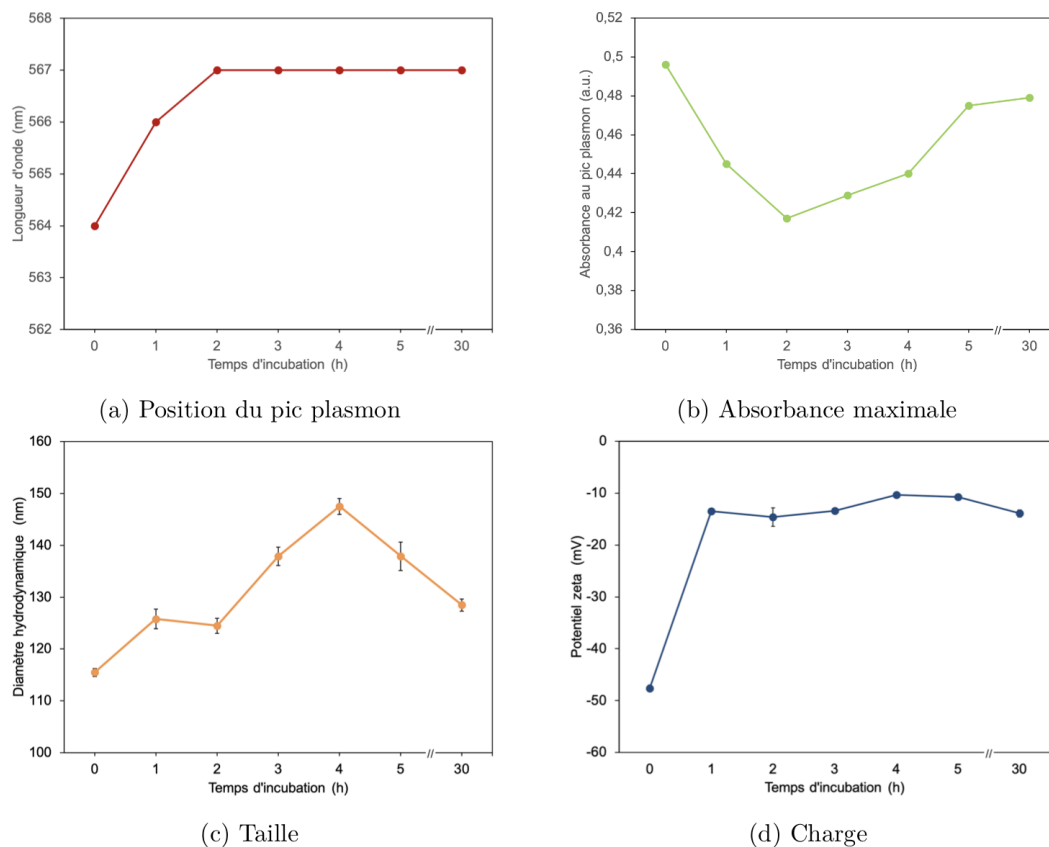


Figure 4.4 Effet du temps d'incubation lors de la PEGylation de nanoparticules d'or de 100nm sur le pic plasmon, le diamètre hydrodynamique et le potentiel zêta. Le temps initial correspond au contrôle sans ajout de PEG.

Un autre paramètre intéressant à observer et à comprendre pour la suite est l'indice de polydispersité (IPD) qui est donné par le logiciel de mesure DLS. Celui-ci est sans dimension et est une bonne indication de la fiabilité de la mesure ainsi que de l'état d'agglomération des nanoparticules. En effet, le fabricant de l'appareil prédit qu'un IPD de moins de 0,1 correspond à des échantillons de nanoparticules sphériques, monomodaux et dont les calculs de taille sont très précis. Pour des IPD de plus de 0,5, la mesure de diamètre hydrodynamique et de potentiel zêta n'est pas recommandée car les échantillons ne sont pas assez uniformes ou les NPs ne sont pas sphériques [47]. Or, la figure 4.5 montre que les IPD pour les AuNPs PEGylées ne dépasse pas 0,1 pour tous les temps d'incubation sauf pour l'échantillon à 4h d'incubation. Globalement, l'évolution de l'IPD suit de près l'évolution de la taille des AuNPs PEGylées avec un pic à 4h de temps d'incubation. On peut donc s'attendre à ce que la fonctionnalisation augmente la taille ainsi que l'IPD.

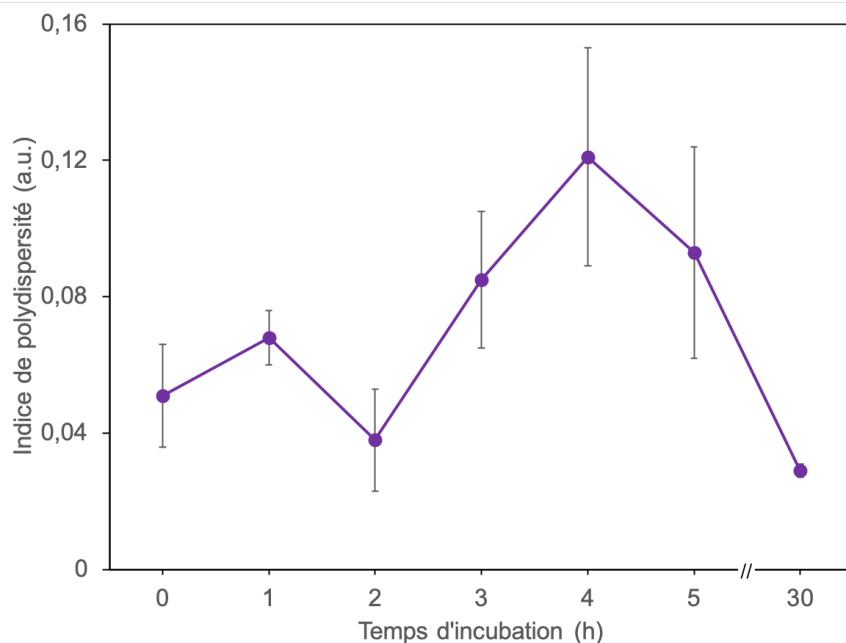


Figure 4.5 Indice de polydispersité des échantillons de nanoparticules d'or de 100nm incubés avec du mPEG-SH durant différents temps d'incubation.

4.2 Fonctionnalisation via EDC/Sulfo-NHS

Cette section présente les résultats de la caractérisation obtenus pour la fonctionnalisation via EDC-NHS, telle que présentée brièvement à la section 2, illustrée à la figure 2.7 et selon le protocole indiqué à la section 3.

4.2.1 Étude préliminaire : détermination du pH optimal pour l'attachement d'anticorps par Surface Plasmon Resonance

Tout d'abord, l'influence du pH sur la fonctionnalisation a été évaluée via une mesure de la SPR (Surface Plasmon Resonance) tel que décrit à la section 3.3. En effet, dans ce protocole de fonctionnalisation le pH a un impact très important, par exemple l'activation du COOH par EDC/NHS est plus efficace avec un pH acide (entre 4 et 6). Deux autres effets dépendant du pH entre en compétition :

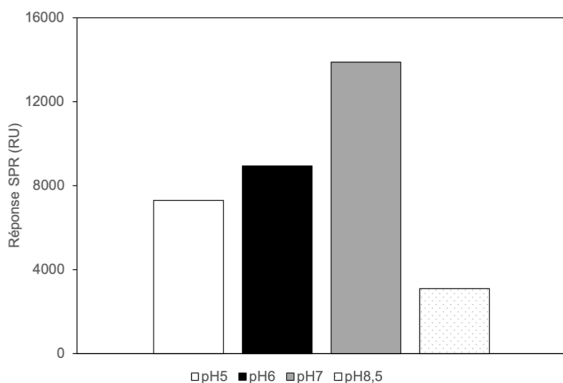
1. Le temps de vie du groupement NHS diminue avec le pH.
2. La disponibilité des amines primaires augmente avec le pH ($NH_2 \rightarrow NH_3^+$).

Afin de déterminer quel facteur l'emporte et d'optimiser le rendement du nombre d'anticorps liés aux AuNPs, les anticorps ont été dilués des solutions tampons à différents pH et le pH optimal a été déterminé en mesurant la SPR tel que décrit à la section 3. Pour vérifier que la réponse mesurée résulte de l'attachement covalent d'anticorps au NHS, un contrôle à été réalisé en injectant des anticorps anti-HER2 sur un canal n'ayant pas été activé avec EDC/NHS. La figure 4.6b démontre bien que le signal reporté à la figure 4.6a est spécifique. Au vu de ces résultats (cfr. figure 4.6), le pH 7 apparaît comme optimal pour maximiser l'attachement des anticorps sur la surface et à donc été choisi comme pH pour le protocole de fonctionnalisation des nanoparticules.

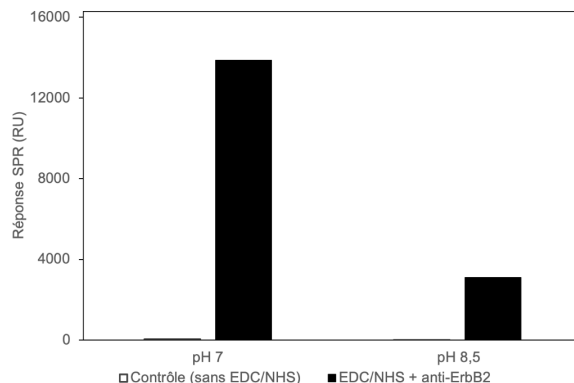
Une fois ce pH appliqué au protocole, les paragraphes suivants décrivent les résultats des tests de caractérisation obtenus sur des AuNPs de 100nm de diamètre.

4.2.2 Spectres

Une bonne reproductibilité des résultats a été observée au fil des expériences et les spectres représentatifs sont présentés à la figure 4.7. Plusieurs éléments témoignent de la présence des anticorps en surface des AuNPs fonctionnalisées. Tout d'abord, on remarque un décalage et un élargissement du pic plasmon (sauf pour les AuNPs-PEG-anti CD24) et une élévation de la courbe basale. Le pic d'absorbance qui débute dans l'UV est dû à l'absorption des cycles aromatiques des anticorps et protéines à 280 nm. Les positions des pics plasmons ont été trouvées grâce à la maximisation de fonctions polynomiales de degré 5 approximant les



(a) Attachement à différents pH après activation avec EDC-NHS.



(b) Comparaison au contrôle négatif pour deux valeurs de pH sans activation avec EDC-NHS.

Figure 4.6 Réponse relative mesurée environ 3 minutes après 3 injections d'anticorps anti-HER2 sur une puce d'or couverte de Dextran.

courbes expérimentales. Ces approximations ont été réalisées sur une plage de 100 nm autour du pic plasmon apparent à l'aide d'une application Matlab (CurveFitting).

Les spectres ont ensuite été normalisés avec la valeur d'absorbance au pic plasmon pour mettre en évidence les élargissements des pics et les élévations des courbes basales. Cette normalisation met également en exergue le bruit associé à certains spectres. Cela est dû à la faible intensité d'absorbance mesurée pour les AuNPs fonctionnalisées. La diminution d'absorbance est principalement liée à deux facteurs : le premier est l'ajout d'une couche de PEG et/ou d'anticorps qui diminue légèrement l'absorbance (cfr. figure 4.3) et le second est la perte de nanoparticules suite à l'étape de centrifugation. Cette perte de NPs provient de leur adhésion aux parois des tubes durant la centrifugation et de la récolte du surnageant qui contient des NPs de haute solubilité et dont la sédimentation est plus difficile. Cette interaction entre les AuNPs et les parois en plastique en présence d'anticorps ou de protéines sera discuté dans la section 6.

4.2.3 Taille et potentiel zeta

Les AuNPs étant achetées commercialement, elles étaient déjà caractérisées. Cependant, ne disposant pas d'appareils de mesures identiques et calibrés de la même façon, il était nécessaire de reprendre certaines mesures sur les AuNPs couvertes de citrate afin de les comparer aux AuNPs fonctionnalisées. Les résultats de la caractérisation des AuNPs commerciales

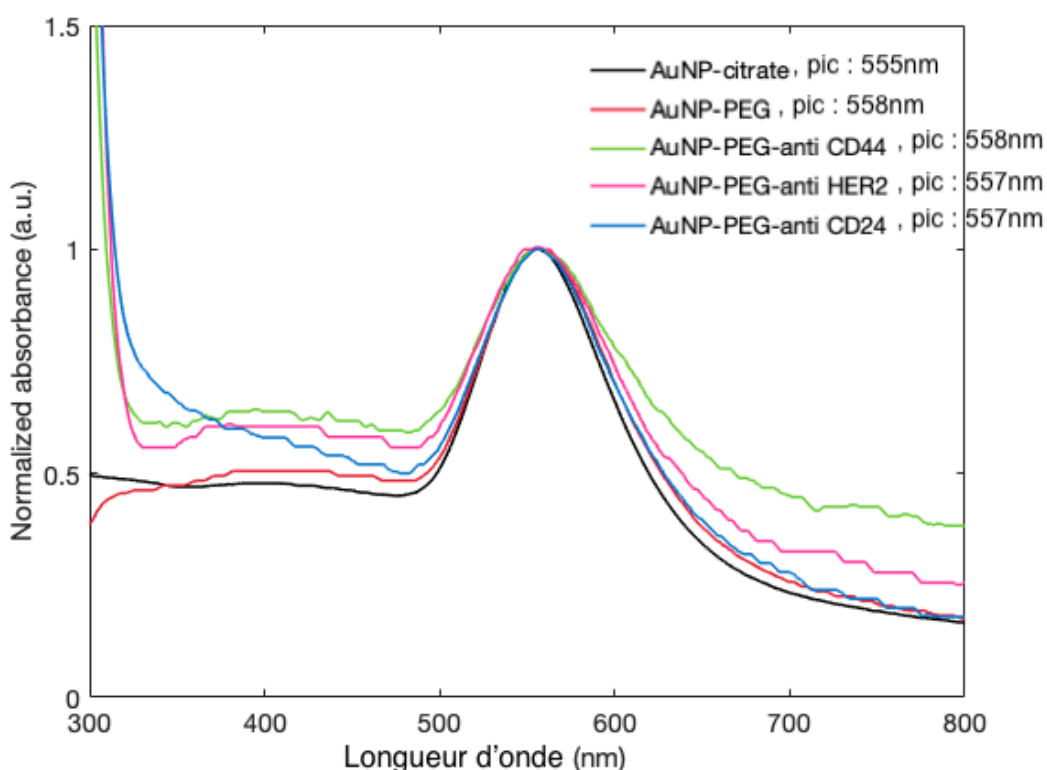


Figure 4.7 Spectres dans l'UV et le visible de AuNPs de 100 nm de diamètre fonctionnalisées avec du PEG et/ou 3 anticorps différents.

étaient très similaires aux spécifications du fabricant. La taille et le potentiel zeta ont été obtenus grâce à la DLS (Dynamic Light Scattering). Les valeurs moyennes sont reprises à la figure 4.8 et un test ANOVA Turkey HSD a été réalisé pour comparer les échantillons entre eux. Parmi les différences significatives qui sont mises en évidence on peut voir que l'ajout de PEG augmente le diamètre hydrodynamique des AuNPs de presque 50 nm. Ceci correspond à une couche de 25 nm d'épaisseur, ce qui est réaliste pour une dense monocouche de PEG en conformation allongée (à l'opposé d'une conformation des PEG de type "champignon" où les chaînes de polymères sont recroquevillées sur elles-mêmes). Le potentiel zeta augmente d'environ 40 mV. Ceci est dû au fait que la couche de PEG écran la charge négative des NPs.

Aucune différence significative n'est détectée entre les échantillons de AuNP-PEG-COOH et AuNP-PEG-anti HER2 ou AuNP-PEG-anti CD24. Cela ne veut pas dire qu'il n'y a pas d'anticorps à la surface mais simplement que le potentiel zeta et le diamètre hydrodynamique ne permettent de faire cette distinction s'il n'y a pas une monocouche d'anticorps. Par contre, une différence est notable pour les AuNP-PEG-anti CD44. Rappelons que ces anticorps conte-

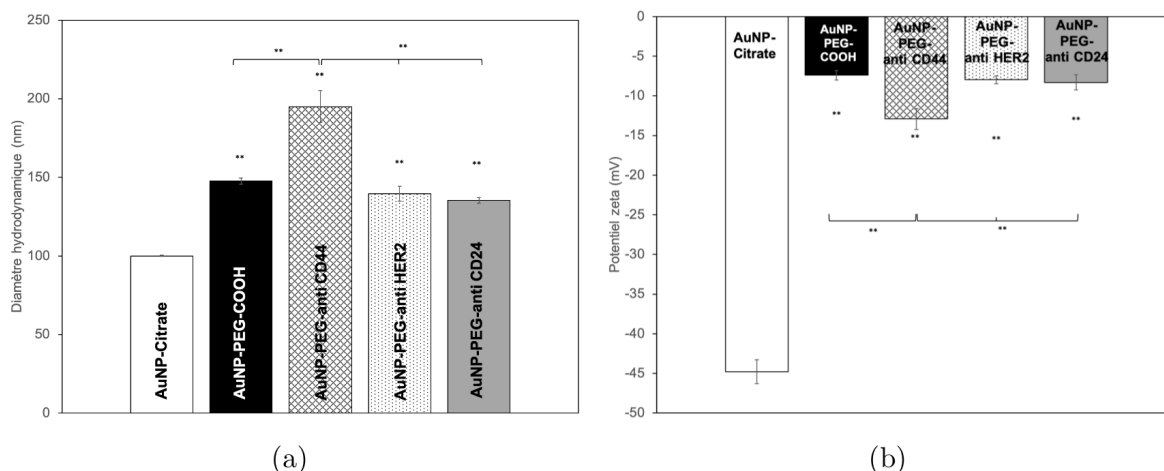


Figure 4.8 Résultats des mesures par *Dynamic Light Scattering*. Les valeurs du test statistique sont données par rapport à l'échantillon de AuNP-citrate sauf si spécifié autrement (** $p=0,01$).

naient initialement un faible pourcentage de BSA, il est donc tout à fait possible que la BSA ait été liée aux nanoparticules, en plus des anticorps et que cela provoque ce changement. L'autre hypothèse est que le niveau d'agglomération dans cet échantillon soit plus élevé. Ce qui est très probable vu l'indice de polydispersité qui est de 0,28. L'imprécision sur la taille calculée pour cet échantillon est donc plus importante que les autres AuNPs fonctionnalisées dont les IPD sont compris entre 0,1 et 0,18.

4.2.4 Imagerie des nanoparticules fonctionnalisées

Comme expliqué précédemment, les méthodes de caractérisation classiques peinent à prouver sans ambiguïté la présence des anticorps en surface des nanoparticules, pour cela une méthode simple et qualitative décrite dans la section 3 a permis de le démontrer. Le montage illustré à la figure 4.9 est le résultat de la fonction *Colocalization* sur Fiji et on constate que de nombreuses nanoparticules sont colocalisées avec la position de la fluorescence des anticorps, ce qui confirme le succès de la fonctionnalisation. Une grossière estimation du pourcentage de nanoparticules qui sont colocalisées avec la fluorescence détectée donne une efficacité de 33%. Ce nombre est déduit du nombre de points colocalisés et du nombre de nanoparticules comptés par la détection automatique des pixels séparés du programme *Analyze particles* de Fiji : 213 points colocalisés/648 AuNPs. On remarque également la présence d'amas fluorescents qui ne sont pas colocalisés avec les AuNPs et qui ressemblent à des agglomérats d'anticorps.

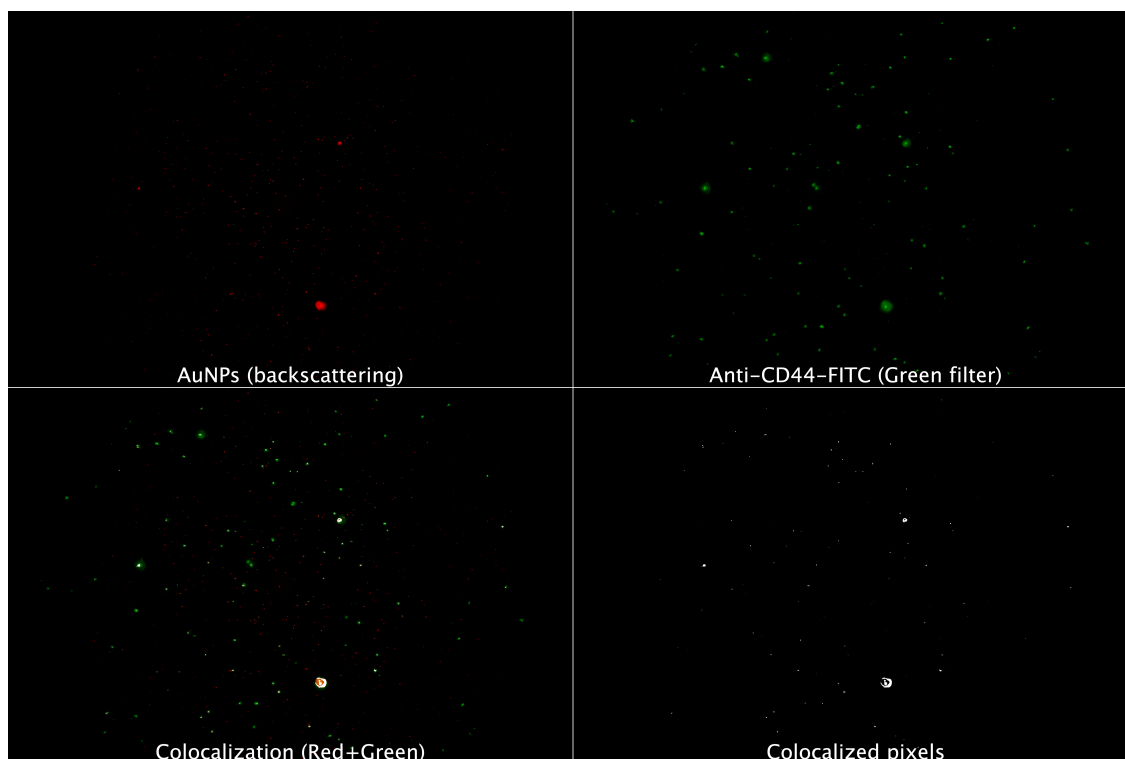


Figure 4.9 Images de microscopie à rétrodiffusion (en rouge) et en fluorescence (en vert) de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec anti-CD44 (FITC). Les points blancs des deux dernières images résultent de la colocalisation des nanoparticules avec la fluorescence. Les couleurs ont été ajoutées artificiellement.

4.3 Comparaison à d'autres stratégies de fonctionnalisation

Bien que le protocole d'EDC-NHS ait beaucoup d'avantages comme une bonne reproductibilité, une facilité d'application et l'utilisation d'un petit nombre de réactifs différents, son principal désavantage reste l'orientation aléatoire des anticorps sur les nanoparticules. C'est pourquoi deux autres stratégies ont été évaluées : NHS (attachement non spécifique mais approche fréquemment utilisée dans le laboratoire) Hydrazide (attachement spécifique au région Fc des anticorps).

4.3.1 Caractérisation

Comme pour le protocole de EDC-NHS, les AuNPs fonctionnalisées ont été caractérisées selon les mêmes méthodes : mesure des spectres d'absorbance, Dynamic Light Scattering et imagerie en fluorescence. Une étape additionnelle a été réalisée pour comparer les protocoles de EDC-NHS et NHS : une quantification du nombre d'anticorps par AuNPs.

Spectres et DLS

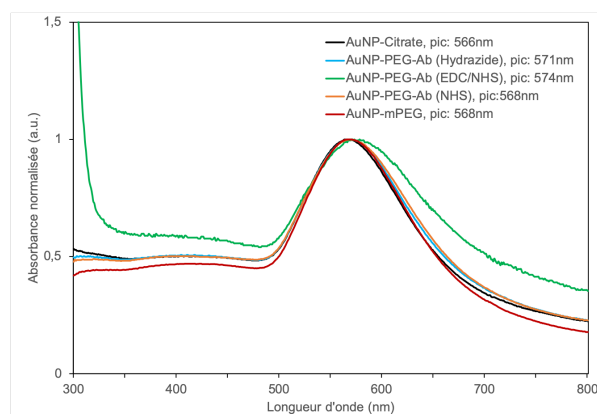


Figure 4.10 Spectres de nanoparticules fonctionnalisées selon 3 protocoles différents.

Les résultats des spectres et de la DLS sont regroupés dans les figures 4.10 et 4.11. Selon ces informations, il semblerait que la couverture des AuNPs soit bien plus importante avec le protocole de EDC/NHS. En effet, c'est l'échantillon qui donne le plus grand décalage et élargissement du pic plasmon, l'absorbance des anticorps est également visible et la différence avec les AuNPs PEGylés au point de vue de la taille et du potentiel zeta est plus grande. L'indice de polydispersité le plus grand est mesuré pour les AuNP-PEG-COOH (1,2), ce qui est assez faible bien que plus élevé que les AuNPs

fonctionnalisées avec NHS ou Hydrazide. Cependant, la DLS ne permet pas de quantifier l'attachement des anticorps.

Une autre information obtenue est que la PEGylation avec mPEG-SH ou SH-PEG-COOH donne des résultats assez différents. Malgré que les chaînes de PEG soient de 5 000 Da dans les deux cas, on remarque que l'augmentation de taille et de potentiel zeta est plus importante pour les AuNP-PEG-COOH. Ceci s'explique par le fait que la concentration initiale de PEG et les temps d'incubation dans les deux protocoles sont différents.

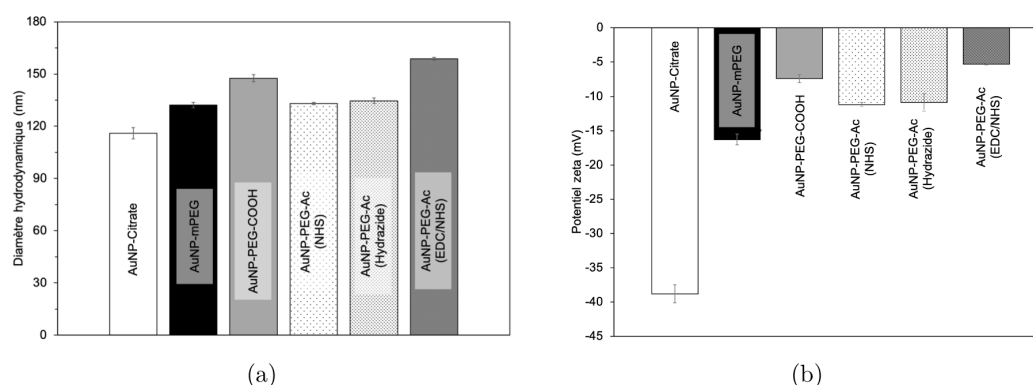


Figure 4.11 Caractérisation par DLS de nanoparticules d'or de 100nm fonctionnalisées selon des protocoles différents.

Images

Pour compléter les résultats précédents, les images des AuNPs conjuguées avec des anticorps fluorescents ont été prises pour les deux nouveaux protocoles et les montages sont présentés dans l'Annexe A aux figures A.1 et A.2. Il faut noter que les anticorps utilisés pour les deux protocoles sont différents et les fluorophores sont ici du Cy3 (qui émet dans le rouge) pour NHS et de l'AF488 (qui émet dans le vert) pour Hydrazide. La colocalisation a démontré la présence des anticorps sur les nanoparticules pour les deux protocoles avec une efficacité (points colocalisés sur le nombre d'AuNPs) de 31% pour NHS et de 28% pour Hydrazide. Il a aussi été constaté que l'intensité en fluorescence perçue pour AF488 était plus faible que pour le Cy3 car le temps d'exposition nécessaire pour obtenir un signal était plus important et le niveau de bruit était aussi plus intense. Cela a pour conséquence d'augmenter la marge d'erreur sur l'estimation du rapport d'efficacité donné précédemment.

Cela peut s'expliquer par le fait qu'il y ait moins d'anticorps présents sur les NPs, que les fluorophores aient subi plus de photoblanchiment ou qu'ils aient un moins bon rendement quantique (photons envoyés/photons ré-émis). Cette dernière hypothèse n'est pas valide car le rendement quantique de l'AF488 est de 0,92 [10] et il est de 0,15 pour le Cy3 [50]. Il est difficile d'estimer l'implication du photoblanchiment mais puisque le temps de vie de l'AF488 est de 4,1 ns comparé à 0,3 ns pour celui du Cy3, il est peu probable que la baisse du signal soit due à cela [51]. L'hypothèse la plus probable serait que la méthode de fonctionnalisation orientée diminue le nombre d'anticorps par nanoparticule, ce qui s'accorde avec les résultats d'autres groupes pour des méthodes spécifiques à la région Fc des anticorps [35]. Par contre, même si le signal est plus faible, le pourcentage de points colocalisés est similaire à ceux des obtenus pour les autres protocoles, ce qui signifie que la fonctionnalisation est aussi efficace.

Quantification

En théorie, on peut estimer le nombre maximal d'anticorps qu'on peut ajouter sur une nanoparticule. Les dimensions d'un IgG sont approximativement $14,5 \text{ nm} \times 8,5 \text{ nm} \times 4 \text{ nm}$ [52], on peut donc envisager deux situations : un cas où les anticorps seraient couchés sur leur longueur et seraient mobiles donc leur projection serait maximale et un cas où ils seraient orientés par leur région Fc et leur projection se limiterait à un disque de diamètre égal à la largeur des régions Fab. Les deux cas de figure sont illustrés à la figure 4.12 et l'aire de ces projections est décrite dans les équations 4.1 et 4.2.

$$A_{max} = \pi(8,5 \text{ nm})^2 = 227 \text{ nm}^2 \quad (4.1)$$

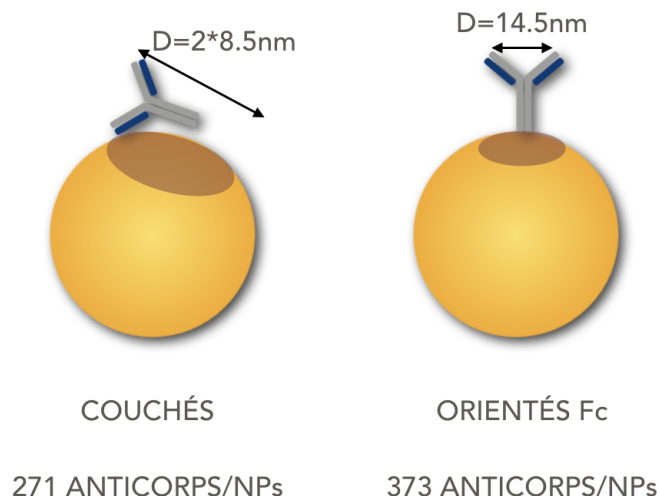


Figure 4.12 Schéma du modèle théorique pour la quantification du nombre maximal anticorps par nanoparticules selon leur orientation.

$$A_{min} = \pi \left(\frac{14,5 \text{ nm}}{2} \right)^2 = 165 \text{ nm}^2 \quad (4.2)$$

Pour une nanoparticule de 100nm de diamètre la surface est de $A_{NP} = 4\pi R^2 = 31400 \text{ nm}^2$ et le nombre d'anticorps théoriques pouvant s'adsorber est de $A_{NP}/A_{max} = 138$ et $A_{NP}/A_{min} = 190$ respectivement (valeurs arrondies à l'unité inférieure). Cela en supposant que l'entièreté de la surface disponible est recouverte, ce qui n'est pas totalement vrai et des espaces seront à l'évidence laissés libres. Cependant, il faut tenir compte de l'augmentation de surface due à la couche de PEG. Pour une couche de 20 nm d'épaisseur, la surface disponible devient égale à $61\,600 \text{ nm}^2$ et le nombre d'anticorps maximal théorique dans le cas d'une monocouche d'anticorps couchés est de 271 contre 373 dans le cas d'anticorps orientés. Ces deux limites sont des valeurs maximales et le nombre d'anticorps effectivement liés peut être bien moindre.

Pour le savoir, une méthode de quantification à l'aide d'anticorps conjugués à un fluorophore a été utilisée. Les résultats obtenus à l'issue de cette quantification sont reportés dans le tableau 4.1. Les masses d'anticorps sont calculées à partir des intensités en fluorescence mesurées et de la courbe de calibration de l'anti-CD44 (FITC) effectuée en présence de AuNPs (cfr. figure 4.13a).

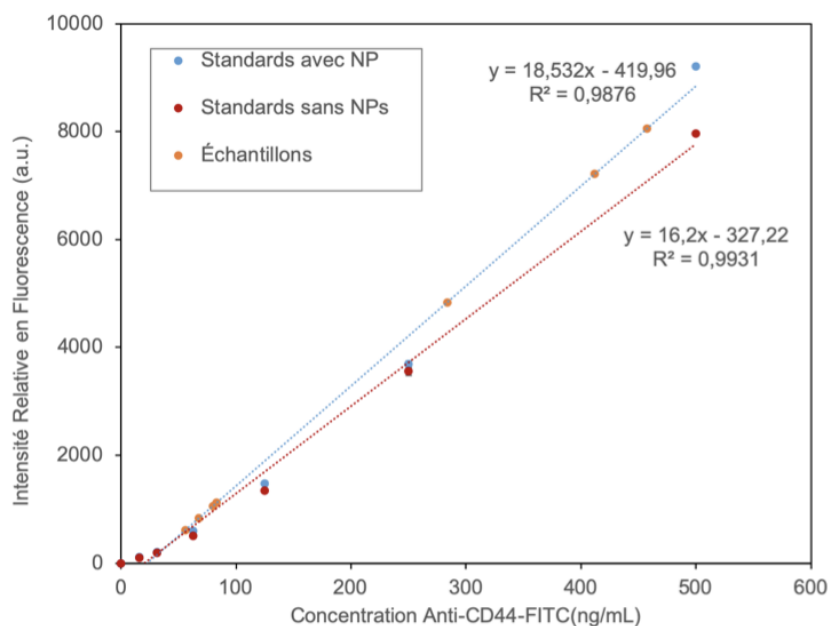
Tableau 4.1 Quantification du rendement de la fonctionnalisation en terme d'anticorps par nanoparticules. Valeurs calculées à partir des mesures d'intensités en fluorescence.

Échantillons	Masse d'Ac	Nombre Anticorps	Nombre AuNPs	Ac/AuNPs	Rendement
Contrôle					
Échantillon final	283,5±25ng	1,14E+12	2,29E+09	497 ± 43	9,95%
Surnageant 1	4118,5±24,3ng				
Surnageant 2	83,2±24,6ng				
Total	4485,2ng				
EDC-NHS					
Échantillon final	80±26,1ng	3,21E+11	1,96E+09	163 ± 53	3,27%
Surnageant 1	4570,7±26,7ng				
Surnageant 2	55,6±22,7ng				
Total	4706,3ng				
NHS					
Échantillon final	67,6±24,2ng	2,71E+11	2,00E+09	135 ± 48	2,71%
Surnageant 1+2	(4818,6 ±43,7ng)				
Total	(4886,1ng)				

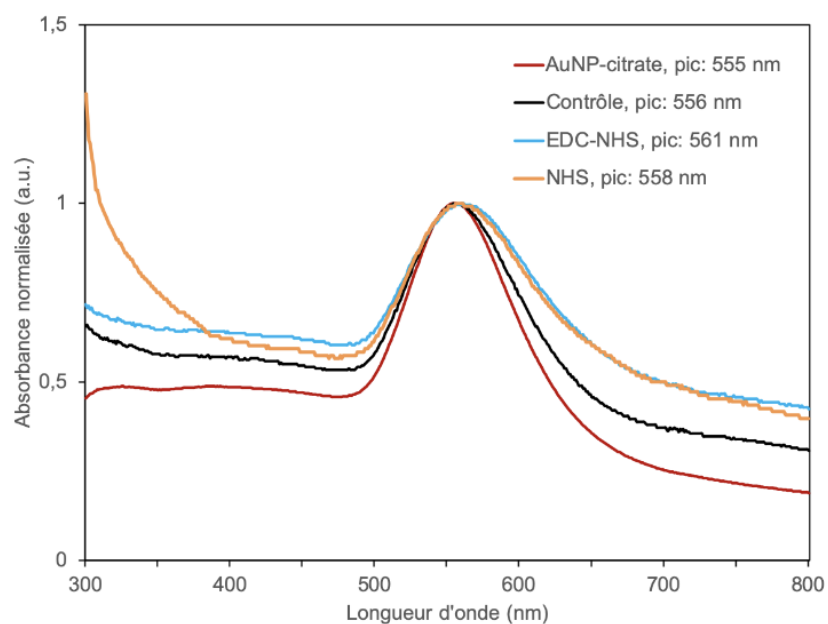
Le rendement total qui est indiqué dans le tableau est calculé à partir de la quantité d'anticorps restant dans l'échantillon de la quantité d'anticorps ajoutée initialement qui était de 5 000 ng pour tous les échantillons.

$$\text{Rendement} = \frac{\text{Masse d'Ac dans échantillon final}}{5000} * 100\%$$

Ces 5 000 ng devraient être la valeur retrouvée dans les lignes de "total", or ce n'est pas toujours le cas. Pour le contrôle et la fonctionnalisation EDC-NHS, le total est entre 4 500 et 4 700 ng. La perte d'anticorps peut provenir de plusieurs facteurs : des Ac adsorbés sur les parois des tubes qui ne sont pas récupérés dans les solutions et ne participent pas à la mesure, des erreurs de pipetage lors de l'ajout des Ac ou encore la marge d'erreur lors de la mesure de fluorescence. Par contre, la quantité d'anticorps mesurée dans le surnageant de l'échantillon NHS se trouvait en dehors des limites de la courbe de calibration (intensité de fluorescence à environ 44 000) et n'est pas représenté à la figure 4.13a. Il aurait fallu diluer davantage le surnageant avant d'effectuer la mesure.



(a) Courbes de calibration de l'anti-CD44(FITC) avec ou sans AuNPs 100nm.



(b) Spectres de AuNPs 100nm fonctionnalisées avec anti-CD44(FITC) selon deux protocoles différents.

Figure 4.13 Quantification du nombre d'anticorps par AuNPs avec la courbe de calibration de FITC en présence de AuNPs et les spectres des nanoparticules fonctionnalisées.

Cependant, un problème un problème survient : la quantité d'anticorps présente dans l'échantillon contrôle est bien plus élevée que dans les échantillons de tests. Pourquoi ? Pour répondre à cette question il faut prendre en compte les autres données à disposition. Les spectres des nanoparticules présentés à la figure 4.13b donnent des informations cruciales sur la composition de la surface des AuNPs. Le pic plasmon pour les AuNPs non fonctionnalisées de ce lot se trouve à 555 nm et le spectre du contrôle de l'expérience à son pic à 556 nm. Il a certaines caractéristiques de la présence d'anticorps en surface comme l'élévation de la courbe à la base du pic et un léger élargissement mais cet élargissement peut également être dû à la couche de PEG. Mais surtout, ces changements sont beaucoup moins importants que pour les échantillons de tests avec EDC-NHS et NHS dont l'élargissement du pic et l'élévation de la courbe basale est plus grande et similaire pour les deux échantillons. De plus, le décalage en longueur d'onde du pic plasmon est bien plus important pour les AuNPs fonctionnalisées que pour le contrôle en comparaison avec les AuNPs couvertes de citrate. Ceci nous indique donc que s'il y a de l'attachement non spécifique d'anticorps, il y en a moins que pour les autres échantillons. Ce qui est contraire au résultat de la quantification.

Aussi, le modèle théorique prédit un nombre maximal d'anticorps par nanoparticules à 373. La valeur trouvée pour le contrôle est donc bien au-delà de cette limite. Il faut notamment se rappeler que la méthode mesure la quantité totale d'anticorps présents dans la solution et ne permet pas de séparer les anticorps non liés des anticorps en surface des NPs. L'hypothèse pouvant expliquer un tel résultat est que dans le cas du contrôle, peu d'anticorps se lient non spécifiquement aux AuNPs-PEG-COOH ou du moins ils ne sont pas adsorbés fortement. Donc il y a beaucoup plus d'anticorps libres en solution et une plus grande portion peut s'adsorber sur les parois en plastique. La quantité d'anticorps à laver étant plus grande, les 2 étapes de centrifugation et de lavage sont insuffisantes et il reste trop d'anticorps dans la solution. Au vu de ces conditions, il n'est pas recommandé d'utiliser ce type de contrôle pour comparer à la quantification d'anticorps sur des nanoparticules fonctionnalisées.

Pour conclure sur cette expérience, il a été trouvé que les rendements d'anticorps conjugués selon les deux protocoles de fonctionnalisation sont autour de 3% et que EDC-NHS produit un rendement légèrement plus haut que NHS. Ceci est semblable aux résultats de l'efficacité mesurée sur les images en fluorescence à la section précédente. EDC/NHS est donc le protocole qui permet la plus grande couverture d'anticorps sur les NPs avec plus d'une centaine d'Ac par NPs. La technique de quantification utilisée est facile, rapide et conviendrait à donner une estimation d'autant plus précise si la méthode de purification des AuNPs fonctionnalisées est efficace pour séparer les Ac libres en solution.

CHAPITRE 5 IMMUNOMARQUAGE *IN VITRO* À L'AIDE DE NANOPARTICULES PLASMONIQUES

5.1 Présentation des lignées cellulaires et des anticorps utilisés

Le grand avantage de la solution proposée est d'effectuer le marquage sur des cellules vivantes en solution. Cependant, cela constitue également un des principaux défis du projet. En effet, cela implique que les nanoparticules n'ont pas facilement accès aux antigènes du cytoplasme ou du noyau des cellules et qu'il faut se limiter aux récepteurs transmembranaires. C'est pourquoi des antigènes d'intérêt clinique pour le diagnostic du cancer du sein et qui respectaient ce critère ont été sélectionnés. Il s'agit du CD44, du HER2 et du CD24. Parmi les anticorps qui ont été obtenus commercialement (Abcam) et produits dans des lapins, seul l'anti-CD44 est monoclonal (clone : EPR1013Y). C'est à dire que tous les anticorps reconnaissent le même épitope et que le risque de liaison non spécifique à d'autres protéines est réduit.

Le choix des lignées cellulaires s'est alors imposé à partir des cellules disponibles en banque du laboratoire et/ou de leur profil moléculaire tel qu'établi dans la littérature mais aussi sur les suggestions des pathologistes partenaires du projet. À la table 5.1 sont résumées les expressions relatives des différents antigènes dans les 3 lignées cellulaires choisies. Pour les MDA-MB-453, malgré que les cellules n'ont pas été testées spécifiquement pour le CD44 ou le CD24, il était prévisible qu'elles soient CD24⁺ et CD44⁻ vu les résultats des travaux de Hosonga & al. [53] sur des cellules HER2⁺. Certaines données étant manquantes et vu les différences entre certains laboratoires dans l'expression des récepteurs cellulaires (cfr. [16, 17, 19, 23] entre autre), il était nécessaire de tester le statut des antigènes sur les lignées cellulaires cultivées au sein du laboratoire à l'aide d'une méthode standard. En raison des équipements disponibles, l'immunofluorescence (IF) était la meilleure option pour effectuer cette comparaison.

Les cellules, à l'origine provenant de ATCC (American Type Culture Collection), ont toutes été cultivées dans des flasques en polystyrène de 25 ou 75 cm² avec du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté de 10 à 20 % de FBS (*Fetal Bovine Serum*) et de 1% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Toutes les lignées cellulaires sont d'origine humaine et ont été dérivées d'échantillons de patientes âgées entre 45 et 60 ans.

Tableau 5.1 Résumé de l'expression de CD44, HER2 et CD24 dans 3 lignées cellulaires tel que trouvé dans [16–18, 54]. Les symboles sont qualitatifs et signifient : ++ surexpression ; – faible expression ; / pas d'expression ; ? donnée manquante.

	CD44	HER2	CD24	Type
MDA-MB-231	++	/	–/	Cellules épithéliales ; adénocarcinome
MDA-MB-453	?	++	?	Cellules épithéliales ; carcinome métastatique
BT-474	–	++	++	Cellules épithéliales ; carcinome canalaire

5.2 Détermination des conditions expérimentales

Les lignées cellulaires sont adhérentes et forment une monocouche de cellules lorsqu'elles sont cultivées dans des flasques ou pétris en plastique. Afin de simuler les conditions réelles d'échantillons de cytopathologie, il a fallu établir un protocole qui tienne compte des limites du modèle *in vitro* 2D. Incuber des nanoparticules avec des cellules vivantes en suspension diluée est un procédé complètement différent que de faire l'incubation sur une monocouche de cellules adhérentes au fond d'un pétri.

5.2.1 Interaction des nanoparticules avec du sérum humain

L'expérience suivante a servi de point de repère pour évaluer l'influence du sérum humain sur la fonctionnalisation de différents types de nanoparticules en vue de simuler des conditions réelles d'incubation avec des échantillons de cytopathologie.

Les nanoparticules d'or de 100 nm de diamètre (AuNP, 50 $\mu\text{g/mL}$, avec citrate) et les nanobâtons de 40 nm x 68 nm (AuNR, 60 $\mu\text{g/mL}$, avec CTAB) ont été achetés chez Nanopartz tandis que les nanoparticules d'alliages or-argent d'environ 97 nm de diamètre (AuAgNP, *Gold Molar Fraction* = 0,5, 150 μM) ont été fournies par Lu Wang, une étudiante au doctorat dans le laboratoire, experte dans la fabrication de nanoparticules d'alliages selon une méthode présentée dans [55]. Le sérum humain a été acheté chez Sigma Aldrich et provient de plasma AB d'hommes aux États-Unis. Dans des tubes à faible affinité de 1,5 mL, 750 μL de nanoparticules et 750 μL de sérum humain (dilué ou non) ont été ajoutés. Dans les contrôles, 750 μL d'eau remplaçait le sérum humain. Les 18 échantillons ont été incubés pendant 1h à température ambiante. Pour la dilution du sérum humain, 75 μL de sérum ont été mélangés à 675 μL d'eau distillé (dilution de 1 :10). Après l'incubation, les tubes ont été centrifugés pendant 5 min à 5 000 $\times g$ (AuNP) ou 10 000 $\times g$ (AuAgNP et AuNR). Une fois le surnageant

retiré, les NPs ont été resuspendues dans 1,5 mL d'eau distillée et 400 μL ont servi à la mesure des spectres en duplicata dans une plaque de 96 puits en polystyrène. Aux 1,1 mL restants de chaque échantillon, 5 μL de 1 M NaCl ont été ajoutés pour la lecture de la taille et du potentiel zeta.

5.2.2 Préparation des échantillons

Immunoplasmonique

Le schéma général de préparation des échantillons et de l'incubation des cellules avec les NPs est illustré à la figure 5.1. Plus précisément, 50 000 à 200 000 cellules trypsinisées et resuspendues dans du DMEM supplémenté de 10% de FBS et 1% PS étaient ajoutées dans un tube de microcentrifugation de 1,5 mL contenant un petit volume de AuNPs fonctionnalisées dans du PBS. Les volumes ont été calculés pour que chaque tube ait le même nombre de AuNPs par cellules, typiquement entre 500 et 1000 ; ces valeurs ont été choisies pour faciliter le décompte manuel des NPs/cellules après l'incubation mais aussi pour ne pas saturer les cellules en nanoparticules et perdre la spécificité du ciblage.

La concentration des AuNPs fonctionnalisées était déduite du maximum d'absorbance (pic plasmon) des spectres et de la courbe de calibration établie pour des AuNPs non fonctionnalisées (cfr. figure 4.3a) en posant l'hypothèse que l'ajout de PEG et d'anticorps avait un impact négligeable sur le coefficient d'extinction molaire. Cette hypothèse a par la suite été infirmée au vu de la courbe de calibration pour des AuNPs PEGylées dont la pente est décalée de 13%. Le nombre de nanoparticules mesuré a donc été sous-estimé¹. Le temps d'incubation à température ambiante était de 45 min pour assurer la viabilité des cellules et limiter l'endocytose des NPs. Pendant ce temps-là, les échantillons étaient mélangés à faible vitesse à l'aide d'un rotateur. Les étapes de centrifugation nécessaires pour séparer les NPs non attachées sur les cellules ou pour évacuer les agents de fixation ont toutes été réalisées à 100 $\times g$ pendant 5 min. Pour l'observation, environ 20 μL des cellules en suspension dans le PBS ont été prélevés et placés sur une lame de microscope standard avec une goutte de milieu de montage. L'échantillon était contenu par un anneau polymérique de 14-18 mm de diamètre et 120 μm d'épaisseur, puis scellé à l'aide d'un mince couvercle de verre.

1. Les 500 ou 1000 NPs par cellules calculé initialement étaient en réalité égales 565 ou 1130 NPs par cellules ajoutées initialement.

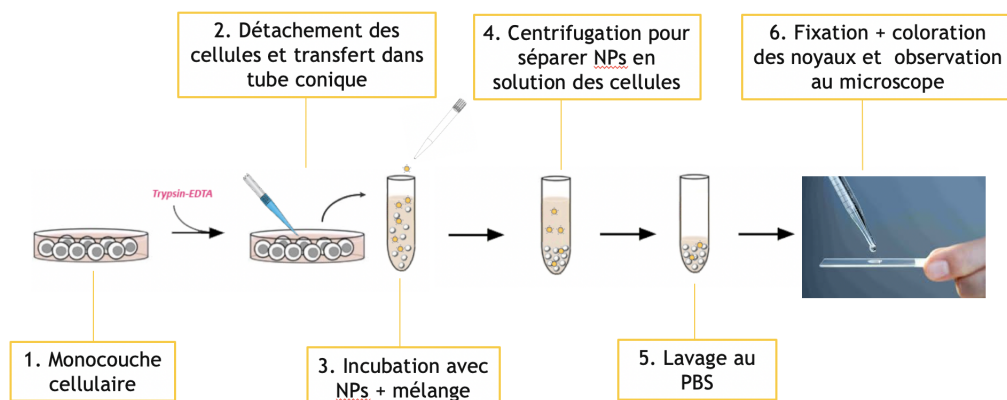


Figure 5.1 Schéma explicatif de la procédure d'immunomarquage des cellules en suspension à partir d'une culture cellulaire adhérente

Une autre condition d'incubation a été testée avec l'ajout de sérum humain au mélange cellules/AuNPs. L'idée de ce test était de voir comment le système allait réagir dans un milieu plus complexe qui contenait des protéines, d'autres anticorps, des lipides et autres molécules pouvant altérer la composition en surface des nanoparticules. En effet, si la solution proposée présente l'avantage d'être appliquée à des cellules vivantes, il faut prendre en compte que les échantillons de biopsies sont très complexes, contiennent parfois du sang et que ce type de milieu aura un effet sur les AuNPs. Une étude préliminaire sur l'interaction entre plusieurs types de nanoparticules et du sérum humain à différentes concentrations a été réalisée selon la méthodologie décrite à la section précédente et montre qu'une quantité plus importante de sérum a moins d'effet sur le spectre et la taille des nanoparticules. Le ratio calculé du volume de sérum par NPs en solution de $2,02 \times 10^{-7} \mu\text{L}/\text{NPs}$ a été choisi pour poursuivre les expériences d'immunomarquage. Les expériences avec le sérum ont été réalisées en même temps que celles dans le milieu de culture complet afin de pouvoir les comparer directement.

Immunofluorescence

Puisque le protocole établi à la particularité d'être effectué sur des cellules "artificiellement" flottantes, il est important que la méthode standard utilisée pour comparer les résultats de l'immunomarquage soit également appliquée à des cellules en suspension. L'immunofluorescence (IF), semblable à l'IHC, utilise des anticorps conjugués à des fluorophores comme agents de détection. Les tests ont été effectués sur les cellules à quelques jours de décalage avec l'immunoplasmonique (un passage cellulaire maximum entre les deux tests) et le principe général est illustré à la figure 5.2.

Pour l'IF, les cellules sont mises en suspension avec l'ajout de 0.25% Trypsine-EDTA et 1×10^6 cellules sont placées dans un tube à microcentrifugation de 1,5 mL. Le culot de cellules après une étape de centrifugation à $200 \times g$ pendant 5 min est fixé durant 10 min à l'aide de 700 μL de solution à 4% formaldéhyde. Après une étape de lavage, les sites d'adsorption non spécifiques sont bloqués pendant 1h par l'ajout de 500 μL de NGS (Normal Goat Serum) dilué à 5% dans du PBS. Les anticorps primaires (par ex. Lapin anti-Humain CD44) dilués à 1% sont alors ajoutés dans les tubes de tests et ils sont incubés pendant 1 h 30 à température ambiante sur un rotateur. Les échantillons sont lavés 3 fois à l'aide de PBS et de centrifugations successives à $100 \times g$ pendant 5 min, ensuite 200 μL d'anticorps secondaires (par ex. chèvre anti-lapin) dilués à 0,1% et 200 μL de DAPI à 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sont rajoutés dans chaque tube sauf dans le contrôle 2. Après une incubation de 30 min, les échantillons sont lavés 3 fois et sont montés sur des lamelles de microscope selon la même procédure que les échantillons d'immunoplasmonique.

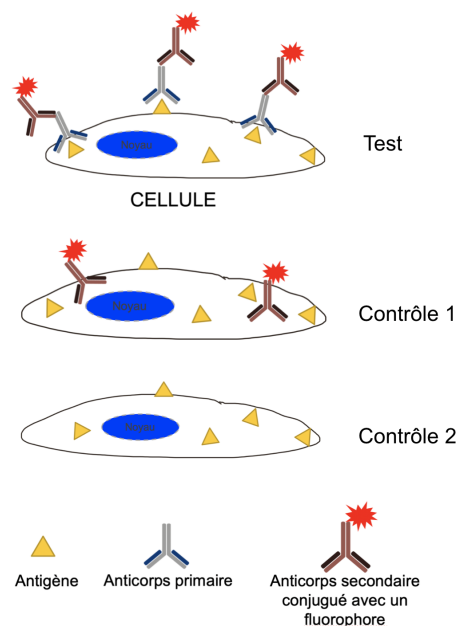


Figure 5.2 Schéma illustrant le test d'immunofluorescence indirecte avec les deux contrôles négatifs utilisés dans le projet.

5.2.3 Imagerie

Une étape importante afin de pouvoir analyser les résultats de l'IP et l'IF est le choix de la technique d'imagerie appropriée. Pour l'immunofluorescence, le montage était composé d'une lampe à fluorescence montée sur un microscope inversé Eclipse Ti de Nikon (Mississauga, ON, Canada) avec des filtres correspondants aux fluorophores utilisés, soit rouge, vert ou bleu (RVB). Les images ont été prises avec une caméra CCD monochromatique QIClick de QImaging (Surrey, BC, Canada) sous une magnification de 20x avec une ouverture numérique de 0,45 et sous une illumination constante (temps d'exposition de 10 s pour le filtre rouge et 46 ms pour le filtre bleu). Les images ont ensuite été analysées avec le logiciel de traitement d'images Fiji de ImageJ.

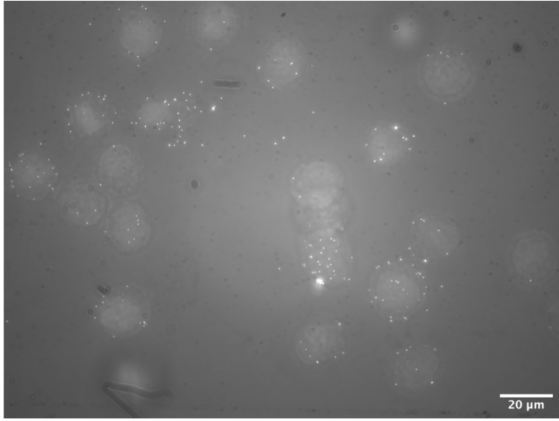
La procédure utilisée est la suivante :

- Trouver et dessiner le contour des cellules par une procédure semi-automatique.
- Mesurer la surface, la moyenne en intensité et la densité intégrée pour chaque cellule ainsi que pour une zone proche de chaque cellule pour le background.
- Reporter les valeurs dans une feuille de calcul et utiliser la formule 5.1 pour le calcul de l'intensité en fluorescence (adapté de [56]).

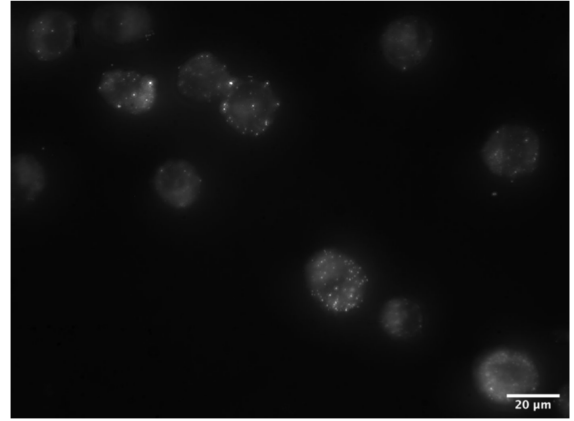
La valeur calculée, appelée fluorescence totale par cellule ou *Corrected Total Cell Fluorescence* en anglais (CTCF), correspond à l'intensité moyenne des cellules normalisée par leur surface et dont le bruit a été soustrait [56]. La formule utilisée pour chaque cellule est indiquée ci-dessous et les valeurs moyennes des CTCF sont représentées à la figure 5.7a.

$$\text{CTCF} = \frac{\text{Densité intégrée} - (\text{Moyenne des intensités du bruit} \times \text{Surface})}{\text{Surface}} \quad (5.1)$$

Plusieurs options étaient à disposition dans le laboratoire pour imager les échantillons d'immunoplasmonique. Le tableau 2.2 à la section 2.4.2 reprend ces différentes méthodes et leurs avantages/inconvénients.



(a) Rétrodiffusion + transmission



(b) Illumination latérale

Figure 5.3 Comparaison d'images prises suivant deux types d'imageries. Échantillon : AuNPs-PEG-anti CD44 sur des MDA-MB-231.

Pour leur simplicité d'utilisation et leur compatibilité avec les microscopes couramment utilisés en pathologie, les techniques de rétrodiffusion et d'illumination latérale ont été utilisées et comparées lors des expériences d'immunomarquage. Les images représentées à la figure 5.3 sont le résultat d'un balayage selon la direction z sur environ $30 \mu\text{m}$ où toutes les images ont ensuite été projetées sur un même plan (projection de l'intensité maximale). La microscopie

en rétrodiffusion a été associée à une illumination en champ clair afin d’avoir une meilleure visibilité de la membrane des cellules et de permettre la différenciation entre les NPs adsorbées sur le substrat et les NPs sur les cellules. Cette méthode nécessite l’utilisation d’un objectif à huile, ici avec une magnification de 60x et une ouverture numérique modulable jusqu’à 1,5. Un objectif sans huile avec une magnification de 60x et une ouverture numérique modulable jusqu’à 0,7 a été utilisé pour prendre les images avec l’illumination latérale.

Pour chaque échantillon, au minimum 3 balayages selon l’axe z (en profondeur) d’environ 30 μm ont été effectués et chaque balayage contenait entre 4 et 15 cellules. La position dans l’échantillon était aléatoire et assurait un grand nombre de cellules dans le champ de vision. Entre 30 et 60 cellules par échantillon ont été photographiées et comptabilisées pour le comptage des nanoparticules.

5.3 Résultats

5.3.1 Modélisation de la sédimentation des nanoparticules dans un pétri de cellules adhérentes

Dans le modèle *in vitro* bidimensionnel de l’incubation de nanoparticules avec des cellules, un des paramètres déterminant sur la quantité de NPs absorbées par les cellules est la concentration initiale en NPs. Or, puisque les cellules sont au fond d’un pétri, la concentration en NPs qu’elles perçoivent n’est pas constante. D’un côté, elle diminue le phénomène d’internalisation des NPs par les cellules et d’un autre côté elle augmente avec la sédimentation des NPs avec la gravité. La diffusion tend cependant à contrebalancer ce processus mais elle n’est pas suffisante pour certaines NPs.

Lors du design d’une expérience d’immunomarquage de cellules avec des NPs, plusieurs paramètres doivent être mentionnés et pris en compte pour connaître la concentration effective de NPs proche des cellules : la concentration initiale, le volume ajouté, les dimensions du pétri, la taille des NPs et le temps d’incubation. Lorsque ces paramètres sont connus, il est alors possible de reproduire l’expérience dans des conditions similaires avec d’autres types de NPs. Pour modéliser ce phénomène, les formules présentées dans [42] ont été appliquées aux AuNPs de 100nm utilisées dans ce projet. Leur article montre également que pour des NPs plus larges qu’une vingtaine de nanomètre, la sédimentation l’emporte sur la diffusion et il est essentiel d’en tenir compte dans le modèle 2D.

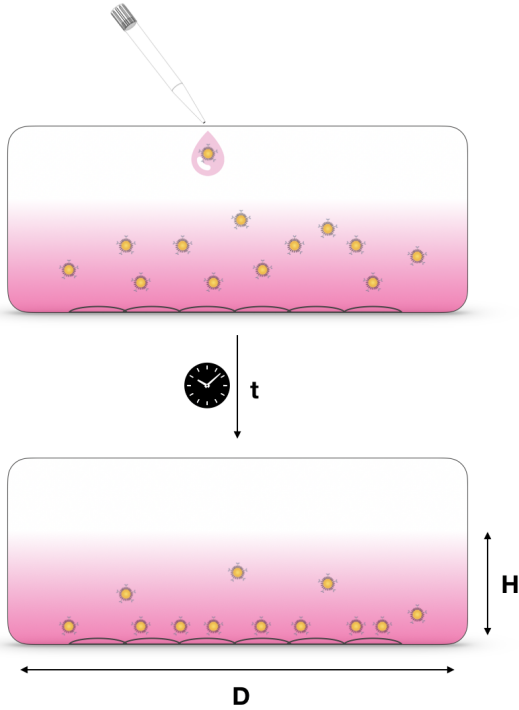


Figure 5.4 Schéma du processus de sédimentation de AuNPs fonctionnalisées lors de l'incubation dans un puits de cellules. Différentes données sont illustrées : H = hauteur, D = diamètre et t = temps d'incubation.

Le schéma à la figure 5.4 illustre également la modélisation de la sédimentation après un temps d'incubation t. Dans ce modèle, des puits à 6 puits de 9 cm^2 ont été utilisés. La hauteur H peut être retrouvée facilement en calculant la hauteur que donne un mL de liquide dans un puits ; avec 1 mL correspondant à 1 cm^3 et en connaissant la surface du puits on a l'égalité $1 \text{ cm}^3/\text{mL} = 9 \text{ cm}^2 \times H$, on trouve alors que H vaut $0,111 \text{ cm/mL}$.

La vitesse de sédimentation des NPs a été calculée à l'aide des équations 5.2 et 5.3 avec un diamètre TEM de 100nm, un diamètre hydrodynamique de 115nm pour des NPs nues, de 140nm pour des NPs PEGylées et de 150nm pour des NPs fonctionnalisées avec du PEG et des anticorps . Les vitesses de sédimentation sont de $5,27 \times 10^{-7} \text{ m/s}$, $2,85 \times 10^{-7} \text{ m/s}$ et $2,66 \times 10^{-7} \text{ m/s}$ pour les NPs nues, PEGylées et fonctionnalisées respectivement.

Ces vitesses ont été obtenues sous l'hypothèse que la densité et la viscosité du milieu de culture ont les mêmes valeurs que l'eau.

$$V_s = \frac{2g\Delta\rho d_h^2}{9\eta} \quad (5.2)$$

où $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ est la constante gravitationnelle, $\Delta\rho = \rho_{NP} - \rho_m$ est la différence des densités des NPs et du milieu, d_h^2 est le diamètre hydrodynamique des NPs et $\eta = 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ est la viscosité du milieu.

$$\rho_{NP} = \rho_p(1 - V_f) + \rho_{Au}V_f \quad (5.3)$$

où $\rho_p \approx 10^3 \text{ kg/m}^3$ est la densité des couches organiques en surface des NP (PEG, protéines, anticorps, etc.), $\rho_{Au} = 19,3 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ est la densité de l'or et V_f est la fraction volumique des NPs et est égal au ratio entre le volume du coeur obtenu par TEM (Transmission Elec-

tron Microscopy) et le volume hydrodynamique obtenu par DLS (1 pour les NPs nues, 0,3644 pour les NPs PEGylées et 0,296 pour les NPs fonctionnalisées).

Dans le cas de nos pétris de 9 cm^2 contenant 1mL de AuNPs dans du milieu de culture, les NPs les plus éloignées des cellules mettraient environ 35min (nues), 65min (PEG) ou 70min (PEG-anticorps) pour parcourir la distance totale par sédimentation. Ces temps représentent le temps d'incubation pour que la totalité des NPs aient atteint la surface des cellules et on néglige ici l'effet de la diffusion et de l'ajout de protéines sur les NPs durant l'incubation dans le milieu de culture.

Finalement, ce modèle met en évidence l'un des effets de l'ajout de molécules organiques sur des NPs d'or en solution, cela diminue leur vitesse de sédimentation mais pas suffisamment pour pouvoir la négliger. Or, la sédimentation va créer un gradient de concentration en NPs dans la solution et ceci doit être pris en compte lors de l'adaptation de protocole d'immunomarquage de cellules en pétri. Dans ce projet, pour avoir plus de liberté et pouvoir uniformiser les conditions d'incubation pour n'importe quel type de nanoparticules, l'incubation a été réalisée sur des cellules en suspension avec une action de mélange pour assurer une répartition homogène des cellules et des NPs.

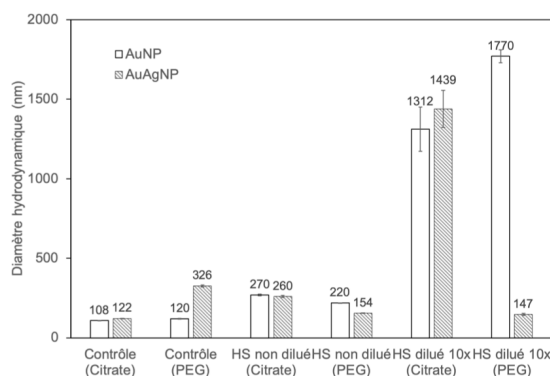
5.3.2 Interaction nanoparticules/sérum humain

Les résultats de cette étude révèlent d'importantes informations. Ici, il était intéressant de comparer les différents types de nanoparticules, dont la composition et la charge en surface variaient et pouvaient influencer leur interaction avec les protéines du sérum. Premièrement, l'addition de protéines sur les NPs est souvent suivie d'un décalage dans la position du pic plasmon. Les positions des pics plasmons des différents échantillons sont reprises dans le tableau 5.2. Étonnamment, il a été trouvé que le décalage est plus important lorsque les NPs étaient incubées avec du sérum dilué, surtout pour les NPs non PEGylées. En observant les données récoltées par DLS, notamment l'indice de polydispersité, on voit que la majorité des échantillons incubés avec le sérum dilué ont subi de l'agglomération (IPD au delà de 0,4 sauf pour les NP d'alliages PEGylées). En accord avec ce qui est mentionné dans la littérature, après incubation avec le sérum toutes les nanoparticules adoptent ou conservent une charge négative en surface [57]. Il faut noter que la taille hydrodynamique n'a pas été mesurée pour les AuNR car ceux-ci ont une forme allongée qui rend difficile l'interprétation des valeurs de diamètre moyen. En conclusion, l'incubation des NPs avec du sérum humain plus dilué provoque une instabilité et une agglomération des nanoparticules, ce qui pose pro-

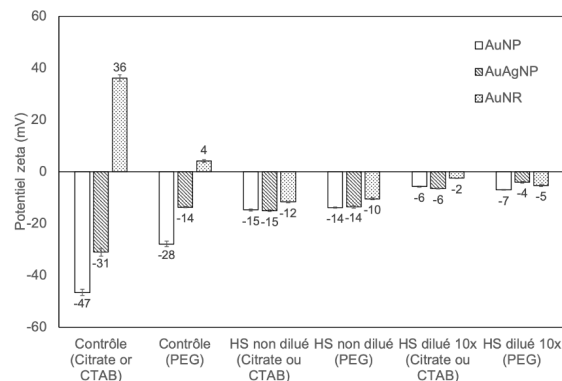
blème pour leur utilisation dans une application d'immunomarquage. Contre toutes attentes, il semblerait qu'une plus forte concentration de sérum limite l'adsorption de protéines sur les nanoparticules et ces dernières conservent une meilleure stabilité. Puisque ce cas de figure est plus proche de la réalité, l'utilisation de sérum non dilué a été choisie pour les tests d'immunoplasmonique. Une hypothèse sur l'explication de ce phénomène est que le sérum dilué serait moins visqueux et le contact entre les protéines et les nanoparticules serait plus favorable.

Tableau 5.2 Position du pic plasmon pour trois types de nanoparticules, avec ou sans PEG, incubées dans différentes concentrations de sérum humain (HS).

λ (nm)	Contrôle	HS non dilué	HS dilué 10x
AuNP			
Citrate	555,5	566	570
PEG	570	577	585
AuAgNP			
Citrate	519	529	537
PEG	523	525	529
AuNR			
CTAB	616	620	627,5
PEG	613,5	613,5	620



(a)



(b)

Figure 5.5 Taille et potentiel zeta mesuré par DLS pour différentes nanoparticules fonctionnalisées ou non avec du PEG et incubées avec du sérum humain à deux concentrations différentes.

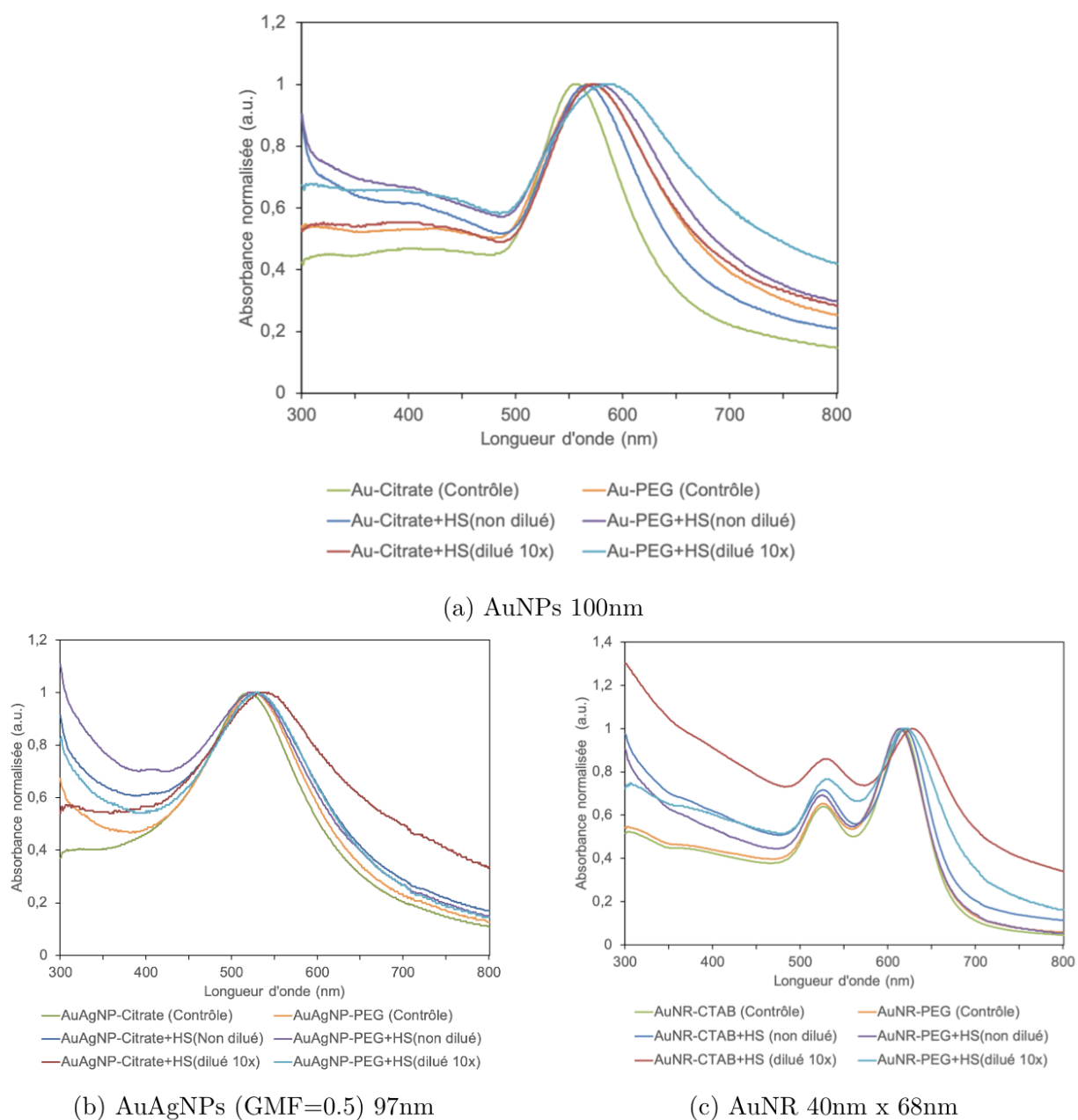


Figure 5.6 Spectres de nanoparticules avec ou sans PEG après 1h d'incubation avec du sérum humain (HS) à deux concentrations différentes.

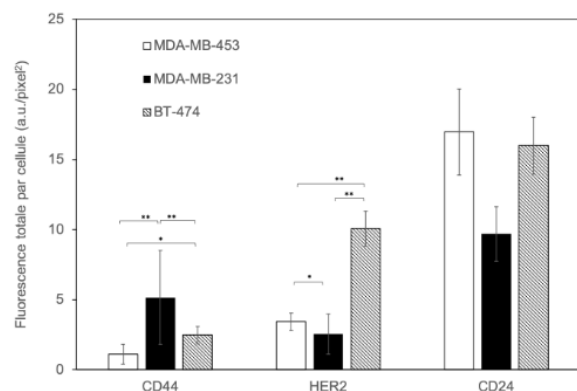
5.3.3 Immunoplasmonique et immunofluorescence

Les valeurs obtenues de l'essai en immunofluorescence et des 3 expériences d'immunoplasmonique sur les MDA-MB-231, MDA-MB-453 et les BT-474 sont toutes illustrées à la figure 5.7. Des images représentatives des échantillons d'immunofluorescence et d'immunoplasmonique sont montrées aux figures 5.8 et 5.9 respectivement. L'expression des antigènes relative à chaque lignée cellulaire (cfr. figures 5.7a et 5.8) est résumée qualitativement dans le tableau 5.3 et comparée aux informations du tableau 5.1. Les valeurs obtenues pour les MDA-MB-453 et les BT-474, deux lignées supposées HER2 positives, sont assez cohérentes avec la littérature mais les valeurs obtenues pour les MDA-MB-231 sont contradictoires. En effet, les MDA-MB-231 sont réputées pour avoir le phénotype de cellules souches ($CD44^+/CD24^{low/-}$) alors qu'ici elles ont un phénotype $CD44^+/CD24^+$, plutôt caractéristique de lignées cellulaires faiblement invasives [54]. Globalement, l'expression de CD44 semble assez faible dans toutes les cellules. Les hypothèses pouvant expliquer ces incohérences seront discutées dans le chapitre 6.

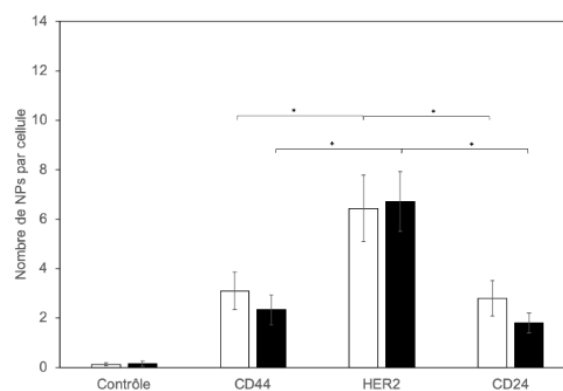
Tableau 5.3 Résumé des expressions de CD44, HER2 et CD24 dans 3 lignées cellulaires telles que mesurées en immunofluorescence. Les symboles sont qualitatifs et ceux entre parenthèses sont tirés de la littérature [16–18, 54] : ++ surexpression ; – faible expression ; / pas d'expression ; ? donnée manquante.

	CD44	HER2	CD24
MDA-MB-231	+ (++)	– (/)	++ (–/)
MDA-MB-453	– (?)	+ (++)	++ (?)
BT-474	– (–)	++ (++)	++ (++)

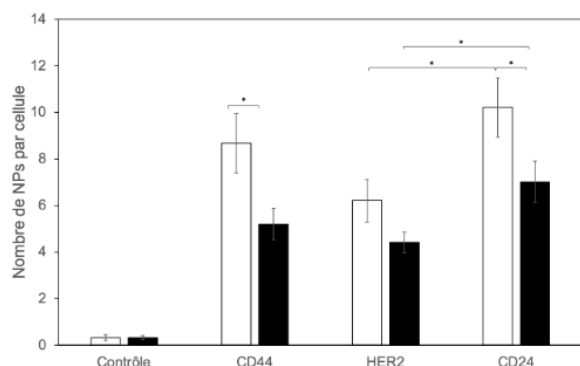
Les résultats de l'IF et les résultats de l'IP sur les cellules correspondantes sont ce qu'il est important de comparer ici. Pour les MDA-MB-231 par exemple (cfr. figure 5.7c), on trouve une très bonne concordance entre les deux pour l'expérience sans sérum humain malgré un niveau de HER2 plus élevé que prévu. L'addition de sérum humain résulte généralement en une diminution du nombre de NPs par cellule et dans le cas des MDA-MB-231, cela affecte particulièrement les AuNPs-PEG-anti CD44 et AuNPs-PEG-anti CD24. Par contre, les AuNPs-PEG-anti CD24 ont donné des résultats négatifs pour les MDA-MB-453 et les BT-474 qui sont CD24 positives selon l'IF. Pour les BT-474 (cfr. figure 5.7d), un faible nombre de nanoparticules a été observé sur les cellules peu importe la fonctionnalisation, ce qui est étonnant vu la forte présence de HER2 et de CD24 mesurée en IF.



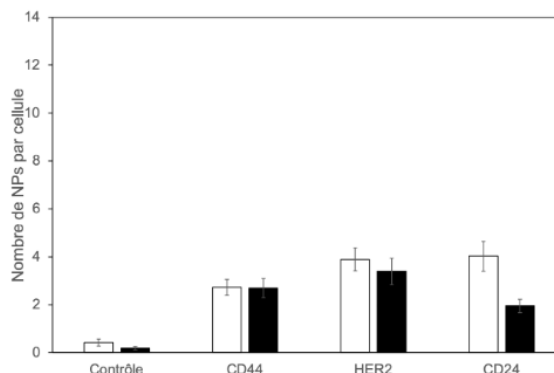
(a) Immunofluorescence



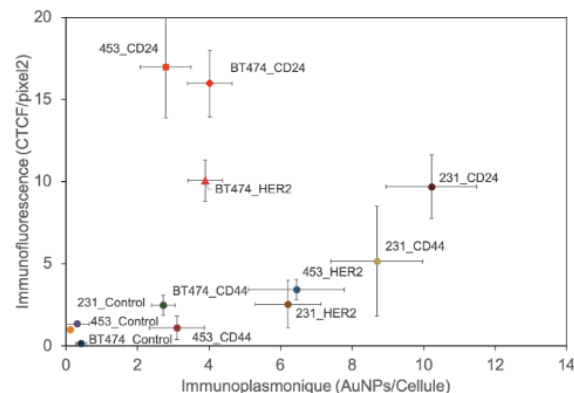
(c) Immunoplasmonique sur MDA-MB-453



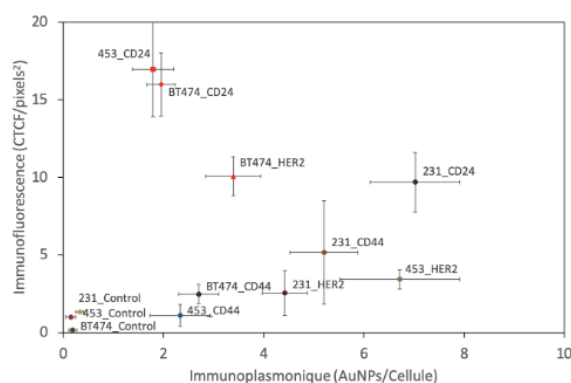
(b) Immunoplasmonique sur MDA-MB-231



(d) Immunoplasmonique sur BT-474



(e) Corrélation IF/IP sans sérum humain



(f) Corrélation IF/IP avec sérum humain

Figure 5.7 Immunofluorescence et Immunoplasmonique sur les 3 lignées cellulaires étudiées. Les barres noires sur les images (b-d) représentent les échantillons incubés avec du sérum humain. (* $p<0,05$ et ** $p<0,01$)

Malgré le faible nombre de nanoparticules, le rapport signal sur bruit est très bon car dans le cas des contrôles négatifs (AuNPs-PEG-COOH) il y a très peu d'attachement avec moins d'une NP par cellule en moyenne et les résultats du test statistique ANOVA a donné des p-value inférieure à 0,001 pour tous les échantillons de NPs avec anticorps comparés aux NPs uniquement PEGylées. Les images représentatives à la figure 5.9 démontrent de l'homogénéité des contrôles négatifs où beaucoup de cellules étaient dépourvues de nanoparticules. Ce résultat confirme la spécificité du signal obtenu avec les AuNPs fonctionnalisées.

En représentant les résultats de l'IF et de l'IP pour chaque condition sur un graphique (cfr. figures 5.7e et 5.7f), on remarque une assez bonne corrélation entre les deux sauf pour trois échantillons : le CD24 sur les MDA-MB-453 ainsi que le HER2 et le CD24 sur les BT-474. Pour ces 3 conditions, les valeurs obtenues en IP sont trop basses par rapport à l'intensité mesurée en IF et cela en présence de sérum humain ou non.

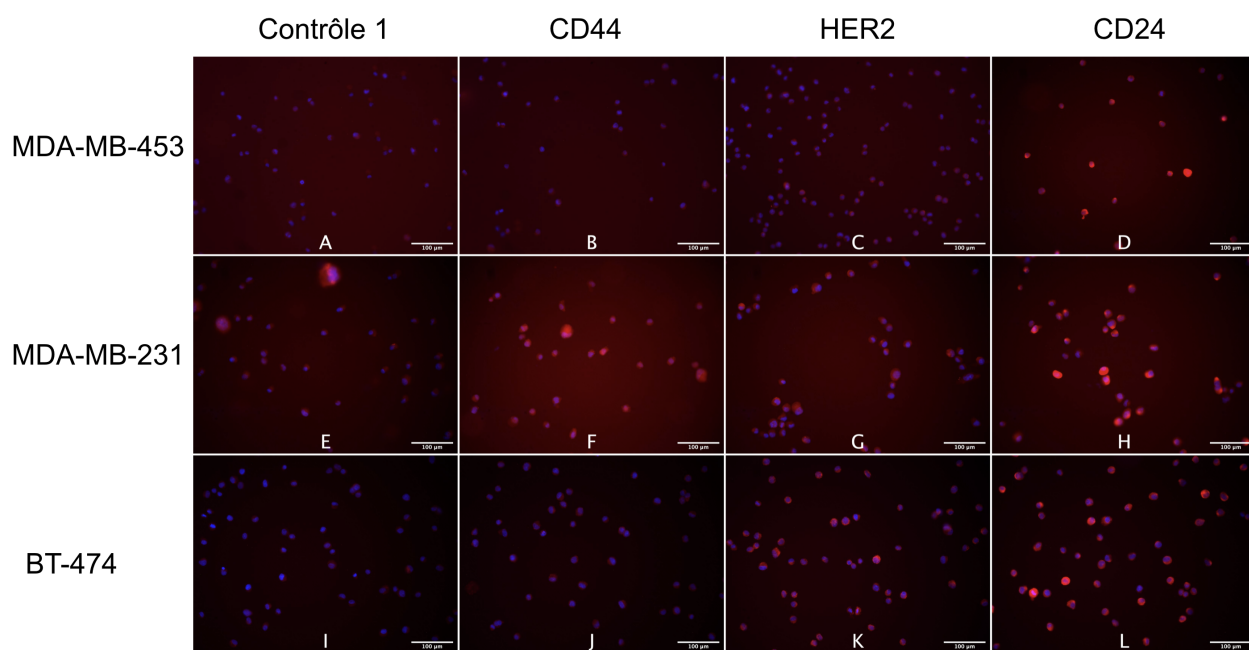


Figure 5.8 Images représentatives de l'essai d'immunofluorescence sur les MDA-MB-453 (A-D), MDA-MB-231 (E-H) et les BT-474 (I-L). De gauche à droite, les colonnes correspondent au contrôle négatif 1 puis au ciblage du CD44, du HER2 et du CD24 respectivement.

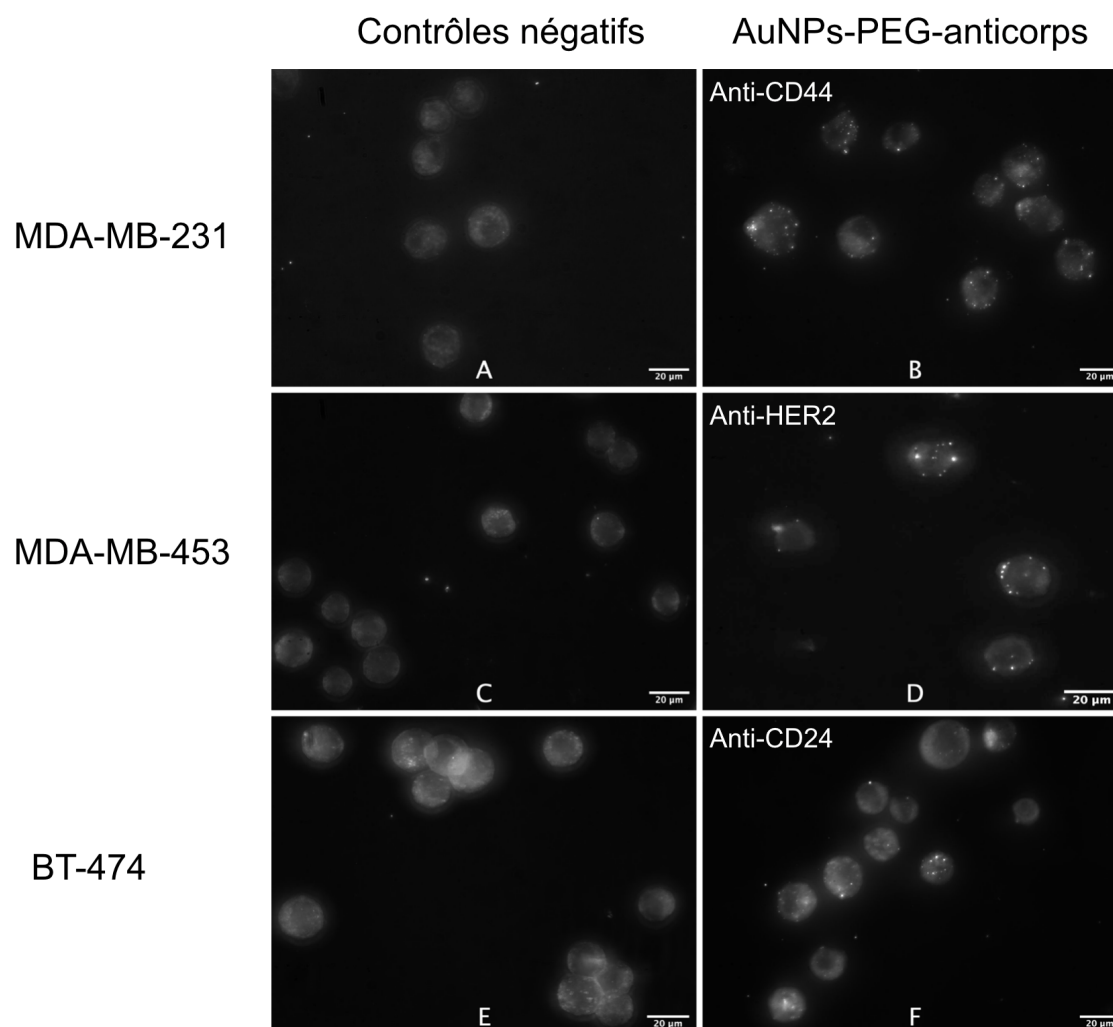


Figure 5.9 Images représentatives de l'essai d'immunoplasmonique en l'absence de serum humain. Contrôles avec des AuNPs-PEG-COOH (A-C-E), AuNPs-PEG-anti CD44 (B), AuNPs-PEG-anti HER2 (D) et AuNPs-PEG-anti CD24 (F).

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

En ce qui concerne la fonctionnalisation, trois protocoles ont été adaptés, testés et comparés. Un résumé de leurs principales caractéristiques est présenté au tableau 6.1. Le critère de stabilité du groupe fonctionnel est basé sur sa facilité d'entreposage et de manipulation à sec mais aussi son temps de vie en milieu aqueux. Les esters de type NHS sont rapidement hydrolysés en milieu aqueux. Dans le protocole NHS, où le groupement NHS est déjà conjugué sur le PEG thiolé, le groupement peut également s'hydrolyser et se détériorer avec le temps à cause de l'humidité dans l'air s'il n'est pas entreposé correctement. La difficulté relative est liée aux procédures en tant que telles, selon le nombre d'étapes nécessaires et les équipements requis (par exemple, les filtres à ultracentrifugation dans le protocole d'Hydrazide). L'avantage des protocoles de NHS et Hydrazide est que la conjugaison des anticorps est découplée de la conjugaison des nanoparticules, ce qui permet de réaliser la première étape à l'avance et de stocker les anticorps conjugués durant une plus longue période dans les conditions optimales pour leur entreposage. L'efficacité relative des protocoles concerne le recouvrement en anticorps qui est déduit des résultats des tests de caractérisation et de quantification des nanoparticules fonctionnalisées.

Tableau 6.1 Comparatif qualitatif des trois approches de fonctionnalisation adaptées et testées dans ce projet.

	EDC/NHS	NHS	Hydrazide
Molécule cible sur l'Ac	Amines primaires	Amines primaires	Aldéhydes (sucres oxydés)
Stabilité du groupe fonctionnel	Moyenne	Faible	Bonne
Orientation des Ac	Aléatoire	Aléatoire	Lié par domaine Fc
Difficulté relative	Facile	Moyenne	Difficile
Stockage	Idem NPs	Possible de stocker NPs et Ac-PEG-SH séparément	Possible de stocker NPs et Ac-PEG-SH séparément
Efficacité relative	+++	++	+
Durée du protocole	≈ 20 h	≈ 7 h	≈ 7h

Le protocole d'EDC-NHS est très reproductible, facile à maîtriser et présente l'avantage de pouvoir être appliqué avec n'importe quel anticorps mais il nécessite d'être amélioré car certains problèmes y sont liés. Notamment, lors de la purification des nanoparticules par centrifugation il y a une forte diminution de leur concentration. Cet effet est peu rapporté

dans la littérature mais a été observé tout au long de ce projet et par d'autres personnes travaillant sur la fonctionnalisation de nanoparticules dans le laboratoire (notamment Kurt Ebeling dans le cadre de sa maîtrise recherche). D'une part, l'ajout de PEG et d'anticorps augmente la solubilité des NPs, ce qui rend leur sédimentation plus difficile et d'autre part, malgré l'usage de tubes à faible affinité, les NPs adhèrent fortement aux parois des tubes durant les étapes de centrifugation et ne sont pas toutes relarguées dans la solution après avoir été soniquées. Cet effet d'adhésion aux parois est encore mal compris mais soulève plusieurs hypothèses. Selon toute vraisemblance, cet effet se manifeste surtout dans les échantillons qui contiennent des anticorps. Les anticorps et les protéines peuvent s'adsorber physiquement sur beaucoup de surfaces (cette propriété est d'ailleurs utilisée dans les tests de type ELISA) et sont moins stables que les nanoparticules, il est donc possible que l'ajout de protéines ou d'anticorps induit une interaction accrue des NPs avec les parois en plastique. Cela s'accord avec le fait que le phénomène n'est pas observé pour les AuNPs-PEG-COOH. Pour pallier ce problème, l'utilisation de sonicateur plus puissant ou l'ajout de surfactants comme du Tween20 pourraient limiter la perte de nanoparticules. Une étude mérite d'être faite afin de trouver les conditions de centrifugation optimales.

Cependant, bien que la méthode de purification soit facile et rapide, elle n'est pas très efficace pour séparer les anticorps libres en solution des nanoparticules. Comme l'a démontré le résultat de quantification des anticorps sur les AuNPs à la section 4, il semble que lorsque la concentration en anticorps libres en solution est élevée, les lavages par centrifugation ne sont pas très efficaces. De plus, la technique de quantification présente le gros désavantage de ne pas faire la distinction entre anticorps liés et anticorps libres en solution. Cette technique est simple et rapide mais surestime le nombre d'anticorps par AuNPs. Il a été constaté également que les mesures ne peuvent pas se baser uniquement sur la soustraction de ce qui se trouve dans le surnageant puisqu'il y a une légère perte d'anticorps durant l'incubation. En effet, le tableau 4.1 montre que la masse totale d'anticorps des surnageants et des échantillons est inférieure à la valeur théoriquement ajoutée aux échantillons. Il est difficile de trouver des méthodes de quantification rapides et précises pour le nombre d'anticorps sur les nanoparticules. À condition que l'étape de purification soit très efficace, la quantification décrite dans ce rapport serait une très bonne pratique.

Concernant l'immunomarquage, un regard critique doit être porté sur les résultats obtenus. Tout d'abord, la comparaison entre l'immunofluorescence et l'immunoplasmonique a été réalisée dans des expériences indépendantes, parfois avec un passage cellulaire de décalage, ce qui peut expliquer des variations entre l'expression des antigènes mesurée en IF et en IP.

Idéalement, il faudrait que ces tests soient standardisés et effectués en parallèle sur le même passage de cellules. L'expression des protéines transmembranaires peut varier en fonction de la phase du cycle où se trouvent les cellules (ex. à confluence l'expression des protéines de croissance peut diminuer) et du milieu de culture dans lequel elles sont cultivées [16]. En outre, cela peut expliquer les différences entre les différents résultats rapportés dans la littérature et ceux observés dans ce projet (cfr. tableau 5.3). D'autres facteurs pouvant expliquer ces différences proviennent de la méthode de détection. L'immunofluorescence ou l'IHC implique le choix d'anticorps qui vont marquer les cellules et ce choix là est déterminant pour pouvoir établir un diagnostic fiable [3]. Généralement, pour augmenter la spécificité, si des anticorps monoclonaux sont disponibles ils seront préférés aux polyclonaux. La nature des anticorps utilisés pour la détection a aussi un impact sur le résultat. D'ailleurs, un test complémentaire d'immunofluorescence a été réalisé sur la lignée cellulaire MDA-MB-231, où les cellules avait subi un faible nombre de passages. La figure 6.1 montre notamment que l'anti-CD44 polyclonal donne un bien meilleur signal que l'anti-CD44 monoclonal. Aussi, le niveau de CD24 est différent. C'est pourquoi il est essentiel d'effectuer les expériences d'IF et d'IP le même jour.

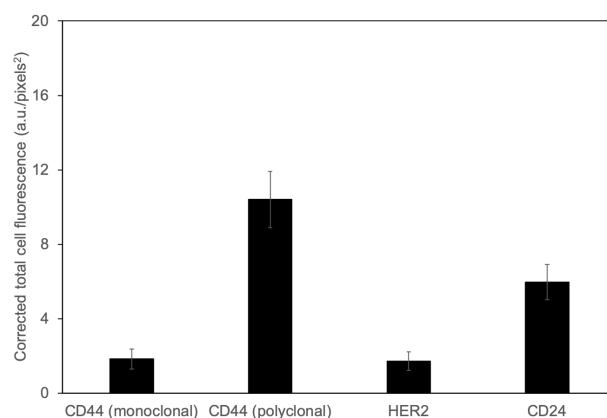


Figure 6.1 Essai d'immunofluorescence sur les MDA-MB-231 à faible nombre de passage cellulaire.

Dans ce projet, l'objectif était de simuler les échantillons de cytopathologie où les cellules étaient en suspension afin de contourner les limites du modèle *in vitro* en 2 dimensions où les interactions entre les cellules sont réduites. Pour cela, les cellules ont été détachées de leur substrat à l'aide de trypsine qui clive les protéines membranaires d'adhésion. Or, la trypsine risque également d'affecter les antigènes d'intérêts et en compliquer la détection. Un groupe a évalué les altérations causées par la trypsine sur certaines protéines de deux lignées

cellulaires (MCF7 et HeLa). Leurs résultats démontrent que toutes les protéines subissaient un changement d'expression suite à la trypsinisation (augmentation ou diminution) et que cette perturbation se prolongeait jusqu'à plus de 24h après le transfert des cellules dans un milieu de culture frais [58]. Ce facteur peut entre autres expliquer la mesure anormalement élevée de CD24 chez les MDA-MB-231 ou la baisse d'expression du CD44 par rapport à leur phénotype classique. Une solution à ce problème pourrait être de détacher les cellules avec une solution dépourvue d'enzyme (à base de EDTA, collagénase ou un mélange disponible commercialement) ou d'établir la preuve de concept avec des cellules flottantes naturellement.

Un autre aspect qui a été abordé est l'ajout de sérum humain en vue de tester l'efficacité du ciblage par les AuNPs en milieu complexe. L'incubation des AuNPs dans le sérum mène à la création d'une couronne de protéines autour d'elles qui peu en altérer les propriétés de surface (le potentiel zêta par exemple). Il est encore mal compris dans quelle mesure cette couronne de protéines affecte l'interaction anticorps-antigène mais cela mène vraisemblablement à une diminution de l'affinité ou de l'accessibilité des anticorps. Globalement, malgré la diminution du nombre de nanoparticules attachées, le sérum humain n'a pas eu d'effet drastique sur la corrélation entre l'IF et l'IP comme l'ont démontrées les figures 5.7e et 5.7f. Cependant, l'action du sérum humain est ici couplée à celle du sérum bovin déjà présent dans le milieu de culture des cellules. Or, des tests effectués sur des nanoparticules polymériques ont démontré des différences de composition en surface après incubation avec du sérum humain ou bovin [59]. Il est donc difficile de prédire avec précision le comportement des AuNPs fonctionnalisées dans un échantillon de cytopathologie frais car ceux-ci sont composés d'un milieu très complexe (protéines, fibres, graisse, sang, etc.) susceptible d'interagir avec les AuNPs.

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATION

7.1 Synthèse des travaux

Le but initial du projet était de concevoir un protocole d'immunomarquage de cellules *in vitro* pour le diagnostic cytopathologique du cancer du sein à l'aide de nanoparticules plasmoniques fonctionnalisées. Plusieurs protocoles de fonctionnalisation ont été testés sur des nanoparticules d'or (AuNPs) de 100nm de diamètre et chacun d'eux est efficace pour lier des anticorps sur les AuNPs. Ces protocoles utilisent des dérivés de PEG thiolés avec des groupes fonctionnels se liant à des molécules différentes sur les anticorps : 1. COOH (ensuite activé par l'addition de EDC/NHS), 2. NHS et 3. Hydrazide. Le premier protocole, nommé EDC/NHS, a été choisi pour poursuivre les procédures d'immunomarquage car les réactifs sont plus stables, il est très reproductible et les résultats de la caractérisation des AuNPs (spectres d'absorbance, DLS, imagerie...) indiquent une meilleure couverture de la surface en PEG et en anticorps. Le protocole d'immunomarquage des cellules à l'aide des AuNPs fonctionnalisées, appelé immunoplasmonique (IP), a été testé sur trois lignées cellulaires du cancer du sein (MDA-MB-231, MDA-MB-453 et BT-474) en ciblant trois antigènes différents (CD44, HER2 et CD24). La méthode a été comparée à une technique standard similaire à l'immunohistochimie qui est l'immunofluorescence (IF), avec dans les deux cas les incubations réalisées sur les cellules mises en suspension. Globalement, une bonne corrélation a été trouvée entre l'IF et l'IP mais les résultats n'ont pas été concluants pour la lignée BT-474. L'expérience a aussi été réalisée en présence de sérum humain afin de simuler des conditions réelles et cela a conduit à une diminution du nombre de AuNPs par cellule mais sans altérer la corrélation avec l'IF.

7.2 Améliorations et travaux futurs

En vue d'obtenir une méthode de diagnostic fiable et commercialisable, plusieurs étapes restent à réaliser.

Contrôle de l'internalisation des nanoparticules

Un des défis que pose la méthode d'immunomarquage sur des cellules vivantes vient de la nature des interactions entre les nanoparticules et les cellules. En effet, comme pour les applications en *in vivo*, les cellules sont actives et ont tendance à internaliser plus ou moins facilement les nanoparticules par endocytose ou d'autres modes d'absorption [41]. Or, si les

NPs se trouvent à l'intérieur des cellules, elles deviennent plus difficiles à détecter par les méthodes d'imagerie présentées dans ce projet et cela peut fausser les résultats du marquage. Cet effet d'internalisation peut cependant être régulé avec la température et le temps d'incubation mais cela reste un paramètre difficile à contrôler. De plus, la mise en suspension des cellules avant l'incubation peut également en altérer l'activité.

Augmentation du nombre de nanoparticules par cellule

Le protocole d'immunoplasmonique utilisé résulte en un faible nombre de nanoparticules par cellules. Malgré que cette valeur soit significative par rapport au contrôle négatif ($p < 0,01$ pour la mesure de tous les antigènes), il est difficile d'établir des seuils de positivité/négativité avec de si faibles valeurs numériques. D'autres études qui ont été menées par le passé sur des puits de cellules adhérentes ont montré qu'il était possible d'avoir un grand nombre de nanoparticules sur les cellules tout en gardant une bonne spécificité du signal [25].

Optimisation de la fonctionnalisation

Des améliorations sont également à faire au niveau du protocole de fonctionnalisation afin d'améliorer le rendement du nombre d'anticorps conjugués, de limiter la perte de nanoparticules durant le processus en jouant sur la méthode de purification et il sera également nécessaire de l'adapter pour d'autres nanoparticules.

Mesure de l'activité des anticorps

Parmi les contrôles qualité effectués sur les nanoparticules, il manque un test rapide et fiable pour rendre compte de l'activité des anticorps sur les nanoparticules. Ainsi, leur durée de conservation pourra être établie avec plus de précision.

Standardisation

Une étude cruciale est à mener avant de pouvoir se fier aux résultats sur des échantillons de patients : il faut établir une standardisation des procédés d'immunoplasmonique et créer des nouveaux seuils de positivité basés sur la quantification des nanoparticules. Cette quantification devra idéalement être semi-automatisée car un comptage manuel augmente la subjectivité et la marge d'erreur.

Tests en co-culture

Une fois que ces étapes seront maîtrisées, il faudra réaliser des tests d'immunoplasmonique sur des cellules en co-culture avec différentes nanoparticules fonctionnalisées avec différents anticorps et démontrer avec plus de robustesse l'efficacité du multiplexage. La finalité reste de tester ensuite ces protocoles sur des réels échantillons de biopsie issu de patients.

RÉFÉRENCES

- [1] Société Canadienne du Cancer, “Cancer du sein,” 2019. [En ligne]. Disponible : <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/breast-cancer/?region=on>
- [2] World Cancer Research Fund International, “Breast Cancer Statistics,” 2018. [En ligne]. Disponible : <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/breast-cancer-statistics>
- [3] D. C. Zaha, “Significance of immunohistochemistry in breast cancer,” *World Journal of Clinical Oncology*, vol. 5, n°. 3, p. 382, 2014.
- [4] H. Nguyen *et al.*, “Surface Plasmon Resonance : A Versatile Technique for Biosensor Applications,” *Sensors*, vol. 15, n°. 5, p. 10 481–10 510, may 2015. [En ligne]. Disponible : <http://www.mdpi.com/1424-8220/15/5/10481>
- [5] P. Wich, “Size-comparison-Bio-nanoparticles nanometer scale comparison nanoparticle size comparison nanotechnology chart ruler,” 2018. [En ligne]. Disponible : <https://www.wichlab.com/nanometer-scale-comparison-nanoparticle-size-comparison-nanotechnology-chart-ruler-2/>
- [6] C. F. Bohren et D. R. Huffman, “Absorption and Scattering by a Sphere,” dans *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. Weinheim, Germany : Wiley, apr 1998, ch. 4, p. 82–129. [En ligne]. Disponible : <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527618156.ch4><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527618156>
- [7] W. Haiss *et al.*, “Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from {UV}-Vis Spectra,” *Analytical Chemistry*, vol. 79, n°. 11, p. 4215–4221, jun 2007.
- [8] D. Rioux *et al.*, “An analytic model for the dielectric function of Au, Ag, and their Alloys,” *Advanced Optical Materials*, vol. 2, n°. 2, p. 176–182, 2014.
- [9] J. A. C. Owen, J. H. C. Punt et S. A. M. H. C. Strandford, *Immunology*, 7^e éd., W. Freeman et Company, édit., New York, dec 2013. [En ligne]. Disponible : <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20091739>
- [10] ThermoFischer Scientific, “Fluorescence Quantum Yields (QY) and Lifetimes (τ) for Alexa Fluor Dyes—Table 1.5.” [En ligne]. Disponible : <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/tables/fluorescence-quantum-yields-and-lifetimes-for-alexa-fluor-dyes.html>
- [11] American Cancer Society, “What is breast cancer?” 2019. [En ligne]. Disponible : <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>

- [12] Réseau Canadien du Cancer du Sein, “Diagnostiquer le cancer du sein,” 2019. [En ligne]. Disponible : <https://www.cbcn.ca/fr/diagnosing-breast>
- [13] American Cancer Society, “Breast Cancer Early Detection and Diagnosis,” 2019. [En ligne]. Disponible : <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection.html>
- [14] The Human Protein Atlas, “Immunohistochemistry.” [En ligne]. Disponible : <https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry>
- [15] —, “Breast Cancer - Protein expression (ERBB2).” [En ligne]. Disponible : https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141736-ERBB2/pathology/tissue/breast+cancer{#}imid{__}5315738
- [16] D. L. Holliday et V. Speirs, “Choosing the right cell line for breast cancer research,” *Breast Cancer Research*, vol. 13, n^o. 4, aug 2011.
- [17] X. Dai *et al.*, “Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping,” *Journal of Cancer*, vol. 8, n^o. 16, p. 3131–3141, 2017.
- [18] J. Jin *et al.*, “Phototheranostics of CD44-positive cell populations in triple negative breast cancer,” *Scientific Reports*, vol. 6, n^o. 1, p. 27871, sep 2016. [En ligne]. Disponible : <http://www.nature.com/articles/srep27871>
- [19] S. VRANIC, Z. GATALICA et Z.-Y. WANG, “Update on the molecular profile of the MDA-MB-453 cell line as a model for apocrine breast carcinoma studies,” *Oncology Letters*, vol. 2, n^o. 6, p. 1131–1137, nov 2011. [En ligne]. Disponible : <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2011.375>
- [20] K. Subik *et al.*, “The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines,” *Breast Cancer : Basic and Clinical Research*, vol. 4, p. 117822341000400, jan 2010. [En ligne]. Disponible : <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/117822341000400004>
- [21] A. L. Weisberg *et al.*, “Physical attributes and assembly of PEG-linked immuno-labeled gold nanoparticles for OCM image contrast in tissue engineering and developmental biology,” *Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XVIII*, vol. 8934, p. 89342V, 2014.
- [22] M. H. Jazayeri *et al.*, “Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies,” *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 9, p. 17–22, 2016. [En ligne]. Disponible : <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.04.002>
- [23] X. Wang *et al.*, “Comparison of four methods for the biofunctionalization of gold nanorods by the introduction of sulfhydryl groups to antibodies,” *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 8, n^o. 1, p. 372–380, 2017.

- [24] G. Tan *et al.*, “Conjugation of Polymer-Coated Gold Nanoparticles with Antibodies—Synthesis and Characterization,” *Nanomaterials*, vol. 5, n°. 3, p. 1297–1316, 2015.
- [25] E. Bergeron *et al.*, “Cell-specific optoporation with near-infrared ultrafast laser and functionalized gold nanoparticles,” *Nanoscale*, vol. 7, n°. 42, p. 17 836–17 847, 2015.
- [26] S. Jeong *et al.*, “Highly robust and optimized conjugation of antibodies to nanoparticles using quantitatively validated protocols,” *Nanoscale*, vol. 9, n°. 7, p. 2548–2555, 2017. [En ligne]. Disponible : <http://dx.doi.org/10.1039/c6nr04683e>
- [27] S. van der Heide et D. A. Russell, “Optimisation of immuno-gold nanoparticle complexes for antigen detection,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 471, p. 127–135, 2016. [En ligne]. Disponible : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.03.001>
- [28] O. Betzer *et al.*, “In-vitro Optimization of Nanoparticle-Cell Labeling Protocols for In-vivo Cell Tracking Applications,” *Scientific Reports*, vol. 5, n°. 1, oct 2015.
- [29] T. Nagy-Simon *et al.*, “Antibody Conjugated, Raman Tagged Hollow Gold-Silver Nanospheres for Specific Targeting and Multimodal Dark-Field/SERS/Two Photon-FLIM Imaging of CD19(+) B Lymphoblasts,” *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 9, n°. 25, p. 21 155–21 168, 2017.
- [30] S. Kumar, J. Aaron et K. Sokolov, “Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties,” *Nature Protocols*, vol. 3, n°. 2, p. 314–320, 2008.
- [31] L. García-Fernández *et al.*, “Conserved effects and altered trafficking of Cetuximab antibodies conjugated to gold nanoparticles with precise control of their number and orientation,” *Nanoscale*, vol. 9, n°. 18, p. 6111–6121, 2017.
- [32] P. P. Joshi *et al.*, “Conjugation of Antibodies to Gold Nanorods through Fc Portion : Synthesis and Molecular Specific Imaging,” *Bioconjugate Chemistry*, vol. 24, n°. 6, p. 878–888, jun 2013. [En ligne]. Disponible : <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/bc3004815>
- [33] V. Efrain Aguero Villarreal, “ORIENTED IMMOBILIZATION OF ANTIBODIES THROUGH RECOMBINANT PROTEIN-G ON ASSEMBLED GOLD NANORODS FOR LABEL-FREE BIOSENSING APPLICATIONS,” Thèse de doctorat, University of Texas at San Antonio, 2017.
- [34] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2008.
- [35] K. Tripathi et J. D. Driskell, “Quantifying Bound and Active Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles : A Comprehensive and Robust Approach to Evaluate Immobilization Chemistry,” *ACS Omega*, vol. 3, n°. 7, p. 8253–8259, 2018.

- [36] B. Saha *et al.*, “The influence of covalent immobilization conditions on antibody accessibility on nanoparticles,” *The Analyst*, vol. 142, n°. 22, p. 4247–4256, 2017. [En ligne]. Disponible : <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7AN01424D>
- [37] N. Elahi, M. Kamali et M. H. Baghersad, “Recent biomedical applications of gold nanoparticles : A review,” *Talanta*, vol. 184, p. 537–556, jul 2018.
- [38] R. Wilson, “The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection,” *Chemical Society Reviews*, vol. 37, n°. 9, p. 2028, 2008.
- [39] M. M. Billingsley, R. S. Riley et E. S. Day, “Antibody-nanoparticle conjugates to enhance the sensitivity of ELISA-based detection methods,” *PLOS ONE*, vol. 12, n°. 5, p. e0177592, may 2017. [En ligne]. Disponible : <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0177592>
- [40] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani et W. C. W. Chan, “Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells,” *Nano Letters*, vol. 6, n°. 4, p. 662–668, apr 2006.
- [41] S. Behzadi *et al.*, “Cellular uptake of nanoparticles : Journey inside the cell,” *Chemical Society Reviews*, vol. 46, n°. 14, p. 4218–4244, 2017.
- [42] E. C. Cho, Q. Zhang et Y. Xia, “The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles,” *Nature Nanotechnology*, vol. 6, n°. 6, p. 385–391, apr 2011.
- [43] S. Patskovsky *et al.*, “Wide-field hyperspectral 3D imaging of functionalized gold nanoparticles targeting cancer cells by reflected light microscopy,” *Journal of Biophotonics*, vol. 8, n°. 5, p. 401–407, jun 2014.
- [44] S. Patskovsky, E. Bergeron et M. Meunier, “Hyperspectral darkfield microscopy of PEGylated gold nanoparticles targeting CD44-expressing cancer cells,” *Journal of Biophotonics*, vol. 8, n°. 1-2, p. 162–167, jan 2015. [En ligne]. Disponible : <http://doi.wiley.com/10.1002/jbio.201300165>
- [45] M. Qi *et al.*, “Cost-effective side-illumination darkfield nanoplasmonic marker microscopy,” *The Analyst*, vol. 144, n°. 4, p. 1303–1308, 2019. [En ligne]. Disponible : <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8AN01891J>
- [46] É. Bergeron *et al.*, “3D multiplexed immunoplasmonics microscopy,” *Nanoscale*, vol. 8, n°. 27, p. 13 263–13 272, 2016.
- [47] Malvern, *Zetasizer Nano*, 2013, n°. 1.1.
- [48] W. Wang *et al.*, “Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein,” *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 148, p. 541–548, dec

2016. [En ligne]. Disponible : <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.09.021https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776516306750>
- [49] GE Healthcare Life Sciences, “Biacore Assay Handbook,” *GE Healthcare Bio-Sciences AB*, p. 1–78, 2012.
- [50] ATdbio, “Cyanines Dyes.” [En ligne]. Disponible : <https://www.atdbio.com/content/32/Cyanine-dyes>
- [51] ISS, “Lifetime Data of Selected Fluorophores.” [En ligne]. Disponible : <http://www.iss.com/resources/reference/data{ }tables/LifetimeDataFluorophores.html>
- [52] Y. H. Tan *et al.*, “A Nanoengineering Approach for Investigation and Regulation of Protein Immobilization,” *ACS Nano*, vol. 2, n°. 11, p. 2374–2384, nov 2008. [En ligne]. Disponible : <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.27633http://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn800508f>
- [53] M. Hosonaga *et al.*, “Expression of CD24 is associated with HER2 expression and supports HER2-Akt signaling in HER2-positive breast cancer cells,” *Cancer Science*, vol. 105, n°. 7, p. 779–787, jul 2014. [En ligne]. Disponible : <http://doi.wiley.com/10.1111/cas.12427>
- [54] C. Sheridan *et al.*, “CD44+/CD24-breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties : an early step necessary for metastasis,” *Breast Cancer Research*, vol. 8, n°. 5, p. R59, oct 2006. [En ligne]. Disponible : <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr1610>
- [55] D. Rioux et M. Meunier, “Seeded Growth Synthesis of Composition and Size-Controlled Gold–Silver Alloy Nanoparticles,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 119, n°. 23, p. 13 160–13 168, jun 2015. [En ligne]. Disponible : <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.5b02728>
- [56] M. Fitzpatrick, “Measuring cell fluorescence with ImageJ,” 2014. [En ligne]. Disponible : <https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cell-fluorescence-using-imagej.html>
- [57] W. Lai *et al.*, “Interaction of gold and silver nanoparticles with human plasma : Analysis of protein corona reveals specific binding patterns,” *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 152, p. 317–325, 2017. [En ligne]. Disponible : <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.037>
- [58] H.-L. Huang *et al.*, “Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells,” *Journal of Biomedical Science*, vol. 17, n°. 1, p. 36, 2010. [En ligne]. Disponible : <http://www.jbiomedsci.com/content/17/1/36>

- [59] K. Partikel *et al.*, “Serum type and concentration both affect the protein-corona composition of PLGA nanoparticles,” *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 10, p. 1002–1015, may 2019. [En ligne]. Disponible : <https://www.beilstein-journals.org/bjnano/articles/10/101>

ANNEXE A IMAGERIE EN FLUORESCENCE DES NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISÉES AVEC LES PROTOCOLES NHS ET HYDRAZIDE

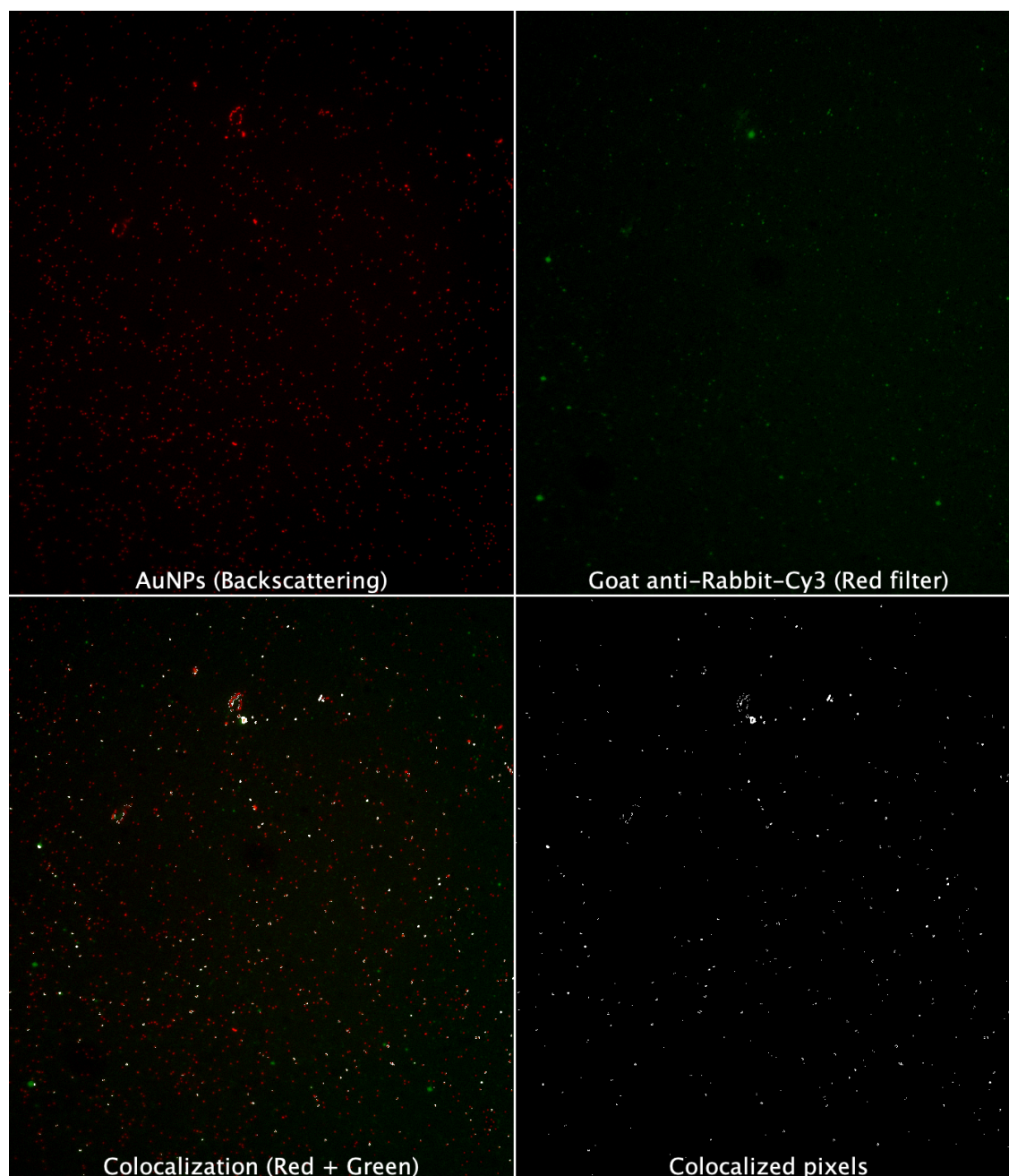


Figure A.1 Imagerie des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec un IgG chèvre anti-lapin (Cy3) selon le protocole NHS. Les couleurs sont ajoutées artificiellement avec le logiciel Fiji.

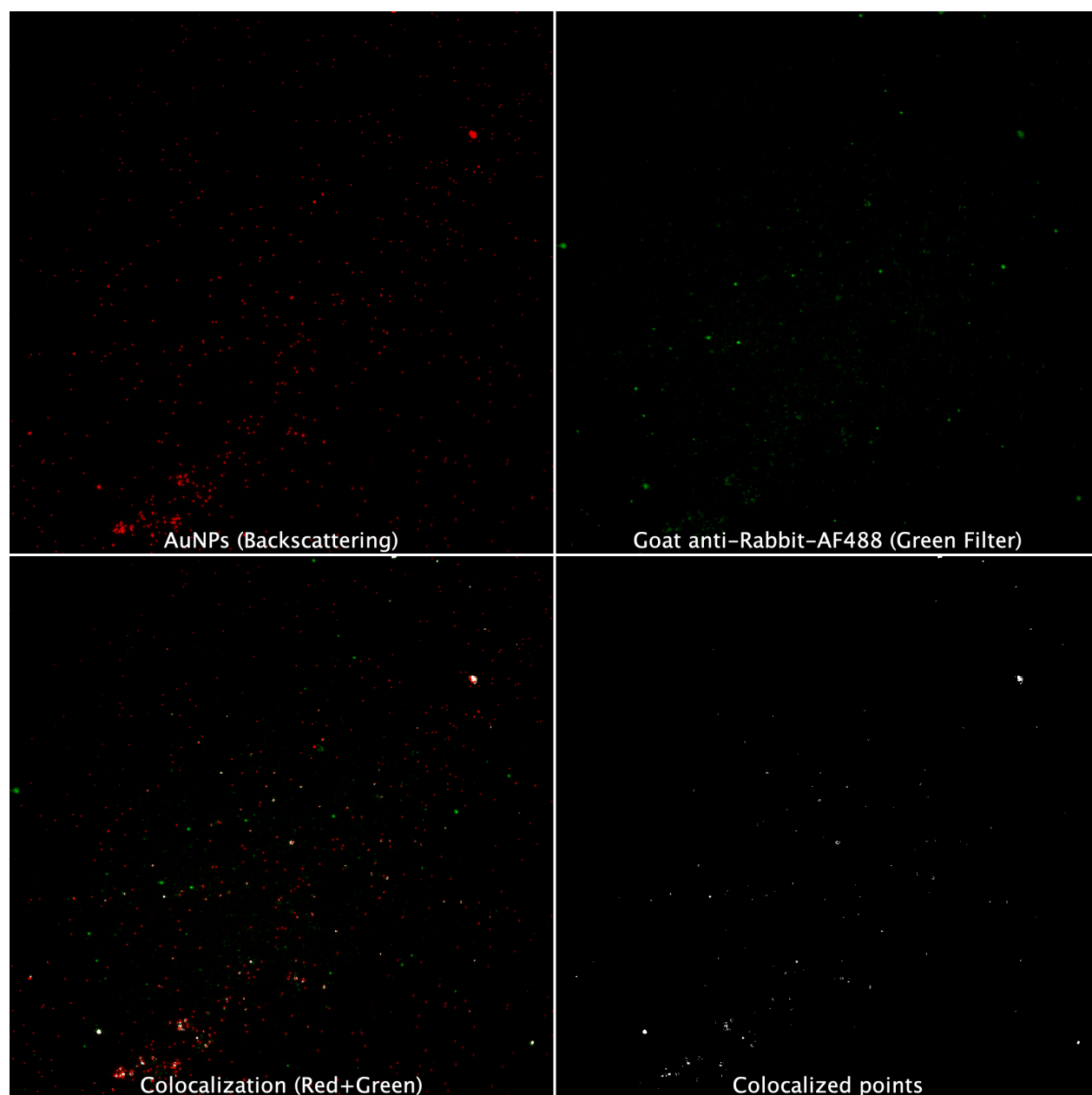


Figure A.2 Imagerie des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec un IgG chèvre anti-lapin (Alexa Fluor 488) selon le protocole Hydrazide. Les couleurs sont ajoutées artificiellement avec le logiciel Fiji.